

**Der Gehalt der Rattenleber an
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen**

Joachim Siedel

1975

Der Gehalt der Rattenleber an 3-Hydroxy-3-methyl-
glutaryl-Coenzym A unter verschiedenen Stoffwech-
selbedingungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Joachim Siedel
aus
Bad Soden am Taunus

München 1975

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1975

Meiner Mutter





Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1972 bis Februar 1975 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Biochemischen Institut der Universität München und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Frau A. Hirsch danke ich für ihre zuverlässige und geschickte Mitarbeit seit Juli 1974.

Mein Dank gilt ferner den Herren E. v. Stetten, Dr. R. Seyffert und Dr. B. Hamprecht für wertvolle Anregungen und Diskussionen, Herrn Dr. J. Huber für die Beratung zu den Tierversuchen, Herrn Prof. Dr. O. Wieland für die Anleitung zur Darstellung des Alloxandiabetes, Herrn Dr. H.J. Dreier für die Alloxanisierung von Ratten, sowie Fräulein R. Zöllner für ihre Mithilfe bei einigen Tierexperimenten.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Verfahren zur HMG-CoA-Bestimmung in Rattenlebern	7
2.1. Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und Gehalt der HMG-CoA-Eichlösung	9
2.2. Reinheit der HMG-CoA-Reduktase	13
2.3. Darstellung von (4R)-4- ³ H-NADPH	16
2.4. Bildung von tritiiertem Mevalonat bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4- ³ H-NADPH	21
2.5. Untersuchung zum Mechanismus der Tritiumübertragungsreaktion bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4- ³ H-NADPH	27
2.5.1. Die enzymatische Glyoxylat-Reduktion als Vergleichsreaktion	29
2.5.2. Die enzymatische Oxalacetat-Reduktion als Vergleichsreaktion	31
2.6. Gehaltsbestimmung von HMG-CoA in der Rattenleber	39
2.7. Identitätsbeweise für das zelluläre HMG-CoA	41
3. Der HMG-CoA-Gehalt der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen	43
3.1. Tag- und Nachtrhythmus	43
3.2. Hunger	44
3.3. Alloxandibabetes	45
3.4. Cholesterolfütterung	47
4. Zusammenfassende Diskussion	49
5. Experimenteller Teil	53

	Seite
5.1. Geräte	53
5.2. Substanzen	54
5.3. Ratten und Standarddiät	54
5.4. Zu Kap. 2.1. (Aktivität der HMG-CoA- Reduktase und Gehalt der HMG-CoA-Eichlösung)	55
5.4.1. Anreicherung der HMG-CoA-Reduktase	55
5.4.2. Darstellung von HMG-CoA	56
5.4.3. Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und des Gehaltes der nach Kap. 5.4.2. her- gestellten HMG-CoA-Eichlösung	56
5.5. Zu Kap. 2.2. (Reinheit der HMG-CoA-Reduktase)	57
5.6. Zu Kap. 2.3. (Darstellung von (4R)-4- ³ H-NADPH)	59
5.6.1. Enzymatische Synthese von NADP ⁺ aus NAD ⁺	59
5.6.2. Enzymatische Synthese von NADPH aus NADP ⁺	60
5.6.3. Abhängigkeit der NADPH-Zersetzung von der Erhitzungsdauer bei verschiedenen pH-Werten	60
5.6.4. Darstellung von (4R)-4- ³ H-NADPH aus 4- ³ H- NAD ⁺ zur radiochemischen HMG-CoA-Bestimmung	61
5.7. Zu Kap. 2.4. (Bildung von tritiiertem Meva- lonat bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4- ³ H-NADPH)	62
5.7.1. Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4- ³ H-NADPH	62
5.7.2. ¹⁴ C-Mevalonatlösung zur Extraktionsstandardi- sierung	62
5.7.3. Isolierung und Reinigung des radioaktiven Mevalonats und Bestimmung seiner Radioakti- vität	63
5.8. Zu Kap. 2.5. (Untersuchungen zum Mechanismus der Tritiumübertragungsreaktion bei der enzy- matischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4- ³ H-NADPH)	65
5.8.1. Enzymatische Reduktion von Glyoxylat mit (4R)- und (4S)-4- ³ H-NADPH	65
5.8.2. Vergleich des Ausmaßes der Tritiumübertragung bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA und Oxalacetat mit (4R)-4- ³ H-NADPH	67

	Seite
5.9. Zu Kap. 2.6. (Gehaltsbestimmung von HMG-CoA in der Rattenleber)	74
5.9.1. Stabilität von HMG-CoA in verdünnter Perchlorsäure	74
5.9.2. HMG-CoA-Extraktion aus Rattenlebern	74
5.9.3. Gehaltsbestimmung von HMG-CoA in Leber-Extrakten	76
5.10. Zu Kap. 2.7. (Identitätsbeweise für das zelluläre HMG-CoA)	78
5.11. Zu Kap. 3. (Der HMG-CoA-Gehalt der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen)	79
5.11.1. Ratten, Käfige, Standarddiät	79
5.11.2. Bestimmung der Ketonkörper und der Glucose im Blut	79
5.11.3. Tag- und Nachtrhythmus der Ratten	80
5.11.4. Gehungerte Ratten	80
5.11.5. Alloxandiabetische Ratten	81
5.11.6. Cholesterolgefütterte Ratten	82
6. Zusammenfassung	84
7. Literaturverzeichnis	86
Lebenslauf	92

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADP	Adenosin-diphosphat
AMP	Adenosin-monophosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
Ci	Curie
cpm, CPM	Gezählte Zerfälle pro Minute
CoA, CoASH	Coenzym A
CS	Citrat-Synthase
d	Tage
DBED-	Di-benzyl-äthylen-diammonium-
dpm, DPM	Desintegrationen pro Minute (echte Zerfälle)
EDTA	Äthylen-diamin-tetraacetat
EtOAc	Essigsäure-äthylester
EtOH	Äthanol
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
HMG	3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäure
HMG-CoA	HMG-Coenzym A-monothioester
I	Isotopeneffekt
I.E.	Internationale Einheiten
K_m	Michaeliskonstante
MDH	Malat-Dehydrogenase
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MVA	Mevalonat
MVL *	Mevalolacton
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
NADPT	in Position 4 des Nicotinamidrestes tritiertes NADPH
PEP	Phosphoenol-pyruvat
POP	Di-phenyl-oxazol-(2,5)
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
T	Temperatur, Tritium
U	Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen, Geschwindigkeit

1. Einleitung

Im tierischen Organismus erfüllt 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) zwei Funktionen: Einerseits stellt es ein Zwischenprodukt der Cholesterolbiosynthese dar, zum andern entsteht aus HMG-CoA im sogenannten "HMG-CoA-Zyklus" (1) die Acetessigsäure als Schlüsselsubstanz der Ketonkörper. Cholesterol wiederum ist ein bedeutender Bestandteil von Membranen und Serum-Lipoproteinen. Mit den Abkömmlingen des Cholesterols, den Gallensäuren und Steroidhormonen, überwacht und steuert der Organismus lebenswichtige Stoffwechselvorgänge.

Die Ketonkörper dienen ihm dagegen in erster Linie als Energielieferanten, die oft in großem Umfang die Glucose als Brennstoff der Zelle ersetzen können. Ihr gehäuftes Auftreten im Blut und im Harn ist eine bekannte Begleiterscheinung pathologischer Stoffwechselzustände wie des Diabetes mellitus.

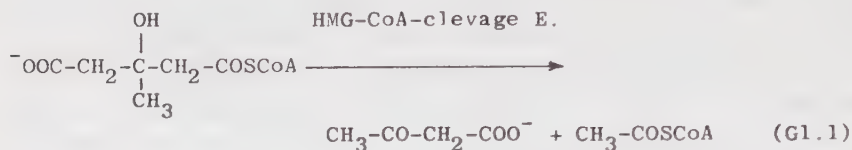
HMG-CoA wird überwiegend durch die Kondensation von Acetyl-CoA, der "aktivierten Essigsäure", mit Acetoacetyl-CoA, zusätzlich aber auch über die Hydratisierung von 3-Methylglutaconyl-CoA beim Abbau der Aminosäure Leucin gebildet (2,3).

Von allen Körperorganen verfügt die Leber über die weitaus größte Kapazität zur Bildung und Verwertung von HMG-CoA (4).

Die Beteiligung von HMG-CoA an der Biosynthese der Terpene und Steroide wurde erstmals 1951 von Lynen postuliert (5,6). Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Bloch über den Aufbau des Cholesterols aus Acetatresten (7-9) vermittelten Lynens Arbeiten über die Natur der "aktivierten Essigsäure" (10) einen völlig neuen Einblick in die Möglichkeit der Biosynthese einer solchen C_6 -Einheit als Vorstufe isoprenoider Strukturen. Zudem machte die Analogie zwischen einer aldolartigen Kondensation von Acetyl-CoA mit Acetoacetyl-CoA zu HMG-CoA und der

Citratsynthese aus Acetyl-CoA und Oxalacetat eine solche Annahme sehr plausibel (6).

1955 beschrieben Robinson et al. (11) ein Enzym, das spezifisch HMG-CoA in Acetacetat und Acetyl-CoA spaltete und bezeichneten es als "HMG-CoA-cleavage Enzyme":

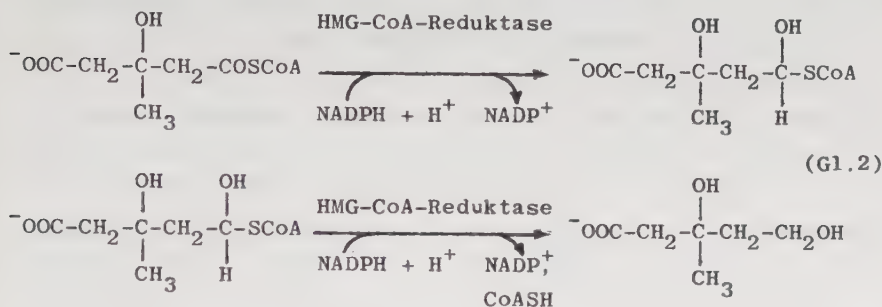


Die Bedeutung dieser Reaktion bei der Ketonkörperbildung wurde 1958 von Lynen et al. erkannt (1); ihre Kenntnis ergab aber keine Anhaltspunkte über die Rolle des HMG-CoA bei der Cholesterolsynthese. In dieser Richtung wurde 1956 ein entscheidender Fortschritt erzielt, als im Folkerschen Arbeitskreis durch einen glücklichen Umstand die Mevalonsäure als hochaktiver, Acetat-ersetzender Wachsfaktor für Lactobazillen entdeckt worden war (12,13) und die auffallende Strukturähnlichkeit dieser Substanz mit der Hydroxy-methyl-glutar-säure Tavormina et al. zum Beweis der Teilnahme der Mevalonsäure an der Cholesterolsynthese geführt hatte (14,15).

Im Anschluß an diese Entdeckung konnten Lynen (16,1) und Rudney (17,18) unabhängig voneinander nachweisen, daß HMG-CoA in Gegenwart roher Hefeextrakte und NADPH als Coenzym durch Reduktion an der Thioestergruppe in Mevalonat übergeführt wird. Die gleiche Reaktion wurde wenig später auch in Leberextrakten aufgefunden (19).

Aus Hefe wurde erstmals das verantwortliche Enzym, die HMG-CoA-Reduktase (E.C. 1.1.1.34), angereichert (20). Wegen des Verbrauchs zweier Moleküle NADPH bei der Bildung eines Mevalonatmoleküls sollte die Gesamtreaktion aus zwei Teilschritten

bestehen; die Ergebnisse neuerer Untersuchungen (21,22) deuten auf folgenden Reaktionsverlauf hin:



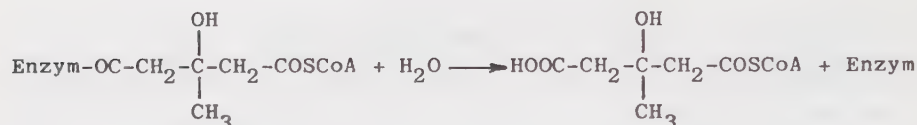
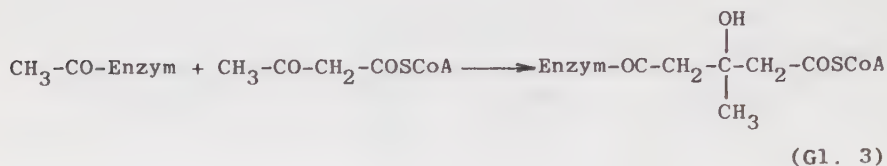
Die Reduktion ist praktisch irreversibel (20).

Die HMG-CoA Reduktase selber, insbesondere die der Rattenleber, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, da diesem Enzym die Schlüsselrolle bei der Regulation der Cholesterolbiosynthese zugesprochen wird (23-25).

Zur gleichen Zeit, als die Identifizierung des HMG-CoA als Ausgangssubstanz der Mevalonatbildung gelang, erfolgte auch die Aufklärung seiner Biosynthese (1,26,27). Sie läßt sich als nucleophiler Angriff der Enolatform des Acetylthioesters auf das Carbonylatom des Acetoacetyl-CoA deuten. Dabei wird die vom Acetyl-CoA stammende Thioesterbindung gelöst, die dem HMG-CoA verbleibende wird vom Acetoacetyl-CoA beigesteuert (1,29). Das Gleichgewicht dieser von der HMG-CoA-Synthase (E.C. 4.1.3.5.) katalysierten Kondensationsreaktion liegt weit auf der Seite des Produktes. Dies ist vor allem im Zusammenhang mit der ungünstigen Gleichgewichtslage der zur Acetoacetyl-CoA-Bildung vorgeschalteten Thiolasereaktion von Bedeutung; nur so können genügende Mengen an Synthesematerial nachgeliefert werden (28,29).

Die von einigen Forschern aufgestellte Behauptung, in Analogie zur Fettsäuresynthese sei Malonyl-CoA an der HMG-CoA- bzw. Isoprenoidsynthese beteiligt (30), konnte nicht aufrechterhalten werden (31,32). Neueste Befunde weisen allerdings darauf hin,

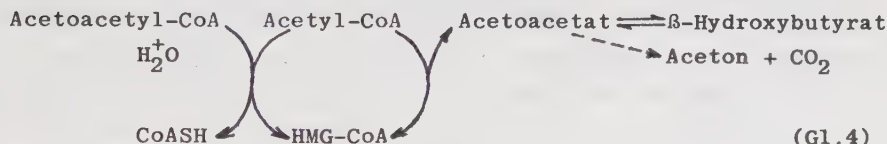
daß nicht Acetyl-CoA direkt, sondern ein intermediär enzymge-
bundener Acetyl-Rest mit Acetoacetyl-CoA reagiert. Im Gegen-
satz zur Citratsynthese erfolgt also hier die Freisetzung des
Coenzym A vor der Kondensationsreaktion (33):



In Zusammenhang mit den Untersuchungen über die Biosynthese des
HMG-CoA gelang Lynen und seinen Mitarbeitern gleichzeitig die
Aufklärung des molekularen Mechanismus der Ketonkörperbildung
durch den HMG-CoA-Cyclus.

Bereits 1865 hatte Gerhardt im Urin zuckerkranker Patienten die
Acetessigsäure entdeckt (34). Das Phänomen der außergewöhnlich
gesteigerten Ausscheidung der Ketonkörper beim Diabetes melli-
tus und auch im Hungerzustand beschäftigte in den darauffolgen-
den Jahrzehnten zahlreiche Ärzte und Naturwissenschaftler.
Während schon bald eine Beziehung zwischen dem Fettsäureabbau
und der Ketogenese erkannt worden war (35,36), herrschte über
die detaillierten molekularen Aspekte weiterhin Unklarheit.
Nach der Entdeckung des Acetoacetyl-CoA (37,38) schien die ein-
fachste Erklärung für die Bildung von Acetoacetat die direkte
Hydrolyse von Acetoacetyl-CoA zu sein (39,40). Nach vergebli-
chen Versuchen, eine Acetoacetyl-CoA-Deacylaseaktivität in
Leberextrakten nachzuweisen, konnten Lynen und seine Mitarbeiter
zeigen, daß zur Synthese von Acetoacetat neben Acetoacetyl-CoA

noch Acetyl-CoA als Cofaktor anwesend sein mußte; das zugehörige Enzymsystem ließ sich bei seiner Reinigung in zwei Proteinkomponenten A und B auftrennen (1). Komponente B wurde als das HMG-CoA-synthetisierende Enzym charakterisiert, Protein A erwies sich mit dem von Robinson et al. beschriebenen "HMG-CoA-spaltenden Enzym" oder der HMG-CoA-Lyase (E.C. 4.1.3.4.) als identisch. Die Ketonkörper entstehen somit aus HMG-CoA in einem (irreversiblen) Kreisprozeß:



Während man allerdings zunächst von einem gemeinsamen HMG-CoA-Vorrat der Zelle für die Ketogenese (deren Enzymsystem vorwiegend in den Mitochondrien gefunden wurde) und die Mevalonatsynthese (die im Cytoplasma lokalisiert ist) ausging und HMG-CoA somit als "branch-point"-Metaboliten ansah (2), lassen neuere Untersuchungen immer mehr eine strikte Kompartimentierung des HMG-CoA in voneinander unabhängige mitochondrielle und cytoplasmatische "pools" als notwendig erscheinen (41-43). Unter diesem Gesichtspunkt könnte die HMG-CoA-Biosynthese je nach ihrer Lokalisation in der Zelle getrennten Regelmechanismen unterworfen sein:

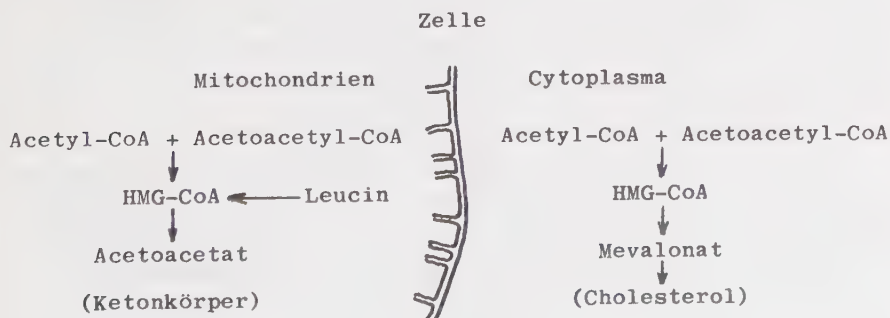


Abb. 1: Kompartimentierung des HMG-CoA-Stoffwechsels in der Leberzelle

Daß aber nicht nur hinsichtlich der Qualität, sondern auch der Quantität beider von HMG-CoA ausgehenden Stoffwechselprozesse ganz erhebliche Unterschiede bestehen, zeigt sich darin, daß die Kapazität der Leber zum Einbau von ^{14}C -Acetat in Acetoacetat etwa 20mal größer ist als die Fähigkeit, ^{14}C -Acetat zum Aufbau von Cholesterol zu verwenden (2,4). Damit steht im Einklang, daß z.B. für die menschliche Leber eine Cholesteroltagesproduktion von 10-15 g (44), von Gould für den gesamten Organismus des Menschen sogar nur 1.5 - 2.0 g angegeben werden (45), während Lynen et al. die maximale Kapazität der menschlichen Leber zur Acetoacetatbildung zu mindestens 150 g/Tag.kg berechnen (1). Diese Kapazität kann im Zustand des akuten Diabetes vollständig ausgelastet sein, was eine ganz außergewöhnliche Stoffwechselleistung darstellt, wenn man zusätzlich noch berücksichtigt, daß es im tierischen Organismus keine anderen Metaboliten gibt, deren Konzentration in einem Bereich von der den Ketonkörpern vergleichbaren Spannweite schwanken kann (46).

Angesichts der Bedeutung des HMG-CoA für die Ketogenese und auch für die Cholesterolbiosynthese mutet es umso erstaunlicher an, daß dieser Metabolit selber als Angelpunkt beider Stoffwechselwege bisher noch nie eindeutig im Lebergewebe nachgewiesen werden konnte. Die von Wieland et al. 1960 angegebenen Daten (47) wurden später wieder zurückgezogen (48).

In der vorliegenden Arbeit soll über die Entwicklung eines neuen, empfindlichen Verfahrens zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von HMG-CoA in der Rattenleber auf der Grundlage der Isotopenmarkierung berichtet werden.

Mit Hilfe dieser Methode sollte auch eine Antwort auf die Frage gegeben werden können, wie sich der HMG-CoA-Spiegel in der Leber unter Stoffwechselbedingungen verhält, die mit einer veränderten Syntheserate der Folgeprodukte dieses Metaboliten verbunden sind. Dazu galt in erster Linie das Interesse Zuständen gesteigerter Ketogenese bei gehungerten und diabeti-

schen Tieren, aber auch Stoffwechsellagen mit variierender Cholesterolproduktion wie im circadianen Rhythmus und bei Cholesterolfütterung.

Durch den zusammenfassenden Vergleich der dabei erzielten Untersuchungsergebnisse ließen sich neue Einblicke in die Dynamik des HMG-CoA-Metabolismus gewinnen; außerdem könnten damit eventuell erste Aufschlüsse über die Art der Verteilung des zellulären HMG-CoA auf das mitochondrielle und das cytoplasmatische Kompartiment erhalten werden.

2. Verfahren zur HMG-CoA-Bestimmung in Rattenlebern

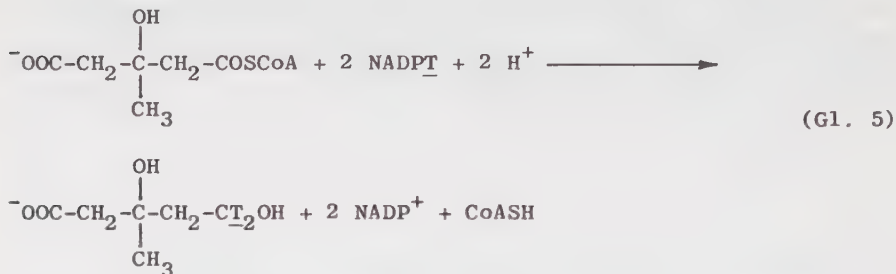
HMG-CoA kann zwar prinzipiell mit verschiedenen optischen Tests bestimmt werden; für den direkten Nachweis in Gewebeerextrakten sind diese Meßmethoden jedoch zu unempfindlich.

Wo derartige Verfahren zur Substratbestimmung versagen, werden heute in der biochemischen Forschung überwiegend die wesentlich empfindlicheren Analysentechniken mit Radiochemikalien eingesetzt. Zur Untersuchung von Metabolitkonzentrationen mit Hilfe radioaktiver Isotope kommen drei Testprinzipien in Betracht (49):

- a) die Isotopenverdünnung
- b) die spezifische enzymatische Umwandlung
- c) die enzymatische Isotopenverdünnung

Von allen radioaktiven Isotopen haben dabei ^{14}C und ^3H die größte Anwendungsbreite erlangt, einmal, weil Kohlenstoff und Wasserstoff die universellen Bausteine der organischen Materie sind, zum andern, weil sie als weiche β -Strahler relativ ungefährlich in der Handhabung sind und sich mit den modernen Methoden der Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie auch noch in kleinsten Spuren quantitativ erfassen lassen.

Zur radiochemischen Bestimmung von HMG-CoA kann man sich die Möglichkeit zunutze machen, durch enzymatische Reduktion dieser Substanz mit in 4-Stellung tritiiertem NADPH radioaktiven Wasserstoff in das entstehende Mevalonat einzubauen. Liegt bei dieser Reaktion das tritiummarkierte NADPH im Überschuß vor, so sollte die Radioaktivität des Mevalonats proportional der eingesetzten HMG-CoA-Menge sein:



Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur HMG-CoA-Bestimmung auf der Grundlage dieser spezifischen enzymatischen Umwandlung.

Dazu war im wesentlichen von folgenden Voraussetzungen auszugehen:

- a) Die Empfindlichkeit der Methode sollte umso größer sein, je höher der spezifische Tritiumgehalt des NADPH war.
- b) Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase mußte hoch genug sein, um die Umsetzung in einer der Empfindlichkeit der Substrate angemessenen Zeit zu ermöglichen; die Enzympräparation durfte dabei keine weiteren substrat- oder produktverbrauchenden Nebenreaktionen katalysieren.
- c) Das tritiierte Mevalonat sollte ohne größere Verluste, aber völlig frei von radioaktiven Begleitsubstanzen aus der Inkubation isolierbar sein.

Alle drei Forderungen konnten erfüllt werden. NADPH mit hohem spezifischen Tritiumgehalt wurde auf enzymatischem Weg aus im Handel erhältlichen 4-³H-NAD⁺ hergestellt.

Die Anreicherung einer den Anforderungen genügenden HMG-CoA-Reduktasepräparation war bereits in der Literatur beschrieben (50).

Das Problem der Mevalonatisolation wurde durch eine Kombination der von Lynen und Graßl ausgearbeiteten Methode zur Extraktion der Mevalonsäure aus wäßrigen Lösungen (51) mit einem dünn-schicht- bzw. säulenchromatographischen Reinigungsschritt gelöst.

Zur HMG-CoA-Bestimmung wird zunächst der neutralisierte Perchlorsäureextrakt aus dem Lebergewebe oder die eine bekannte HMG-CoA-Menge enthaltende Eichlösung mit HMG-CoA-Reduktase und einem Überschuß an tritiertem NADPH inkubiert. Nach vollständigem Substratumsatz werden die enzymatischen Vorgänge durch kurzzeitiges Erhitzen der Reaktionsmischung abgestoppt und eine bekannte Menge ^{14}C -markierten Mevalonats zur späteren Berechnung der Isolationsausbeute zugesetzt.

Die Probe wird über P_2O_5 im Vakuum zur Trockene eingeeengt und der Rückstand mit verdünnter H_2SO_4 angesäuert, um das Mevalonat in das Lacton der Mevalonsäure zu überführen. Durch Zugabe von wasserfreiem Na_2SO_4 wird die überschüssige Säure gebunden; das Mevalolacton kann anschließend mit Äther aus der Mischung extrahiert werden. Zur vollständigen Reinigung wird es entweder einer Dünnschicht- oder einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit polaren organischen Solvenzien unterworfen. Der Gehalt des Eluats an ^3H - und ^{14}C -markiertem Mevalolacton wird mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie ermittelt.

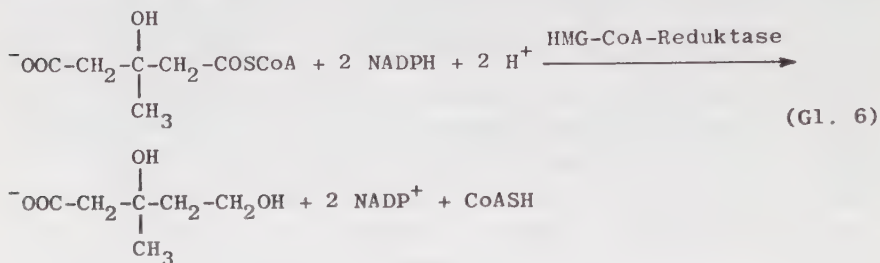
2.1. Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und Gehalt der HMG-CoA

Eichlösung

Die partielle Reinigung der HMG-CoA-Reduktase aus Bäckerhefe erfolgte nach der Vorschrift von Kirtley und Rudney (5) bis zum Eluat der Zinkacetatfällung. HMG-CoA für die Aktivitätsbestimmung wurde nach der von Hilz et al. (3) beschriebenen Synthesemethode in geringfügig modifizierter Weise gewonnen. Diese HMG-CoA-Präparation diente später auch zur Eichung des

radiochemischen Bestimmungsverfahren für HMG-CoA in der Rat-
tenleber.

Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und Gehalt der HMG-CoA-Eich-
lösung können gleichzeitig im optischen Test gemäß der Reaktion
ermittelt werden:



Die spezifische Aktivität betrug durchschnittlich 0.25 U/mg
Protein; für die HMG-CoA-Bestimmung ergab sich folgendes Bild:

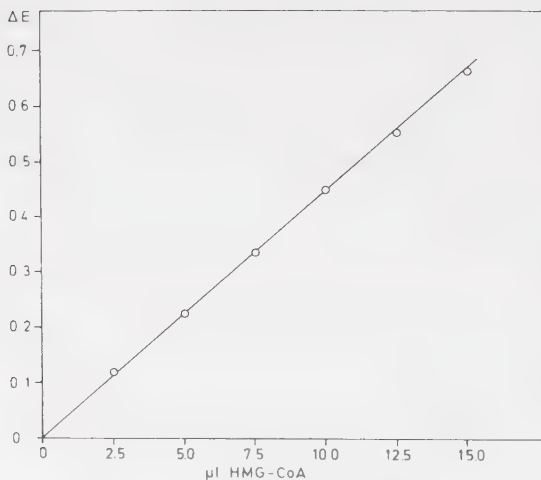
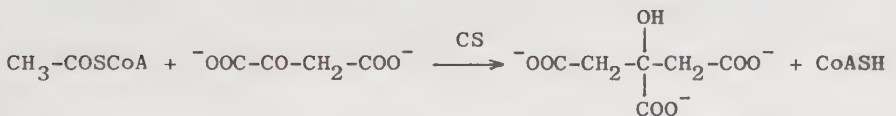
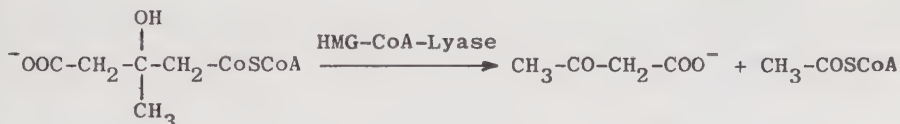


Abb. 2: Abhängigkeit des NADPH-Verbrauchs von der eingesetzten
HMG-CoA-Menge im optischen Test.
(V = 1.00 ml, d = 1.00 cm, λ = 334 nm). Weitere exptl.
Einzelheiten s.S. 56.

Die Möglichkeit eines weiteren optischen Tests für HMG-CoA besteht darin, HMG-CoA mit der HMG-CoA-Lyase in Acetacetat und Acetyl-CoA zu spalten; das entstehende Acetyl-CoA wird mit Oxalacetat und der Citratsynthase zu Citrat kondensiert. Das Oxalacetat wird dabei in einer NAD^+ -abhängigen Dehydrogenase-Reaktion aus Malat bereitgestellt:



(Gl. 7)



Bei der Auswertung dieses Tests muß das vorgeschaltete MDH-Gleichgewicht berücksichtigt werden (52). Die Methode ist wegen des Verbrauchs von einem Mol NAD^+ /Mol HMG-CoA nur halb so empfindlich wie der Reduktase-Test. Da aber aus anderen Gründen während der Arbeit die HMG-CoA-Lyase aus Rinderleber angereichert wurde (s. Kap. 2.7.), konnte vergleichsweise eine HMG-CoA-Bestimmung im Reduktase- und im Lyase-Test durchgeführt werden. Die mit beiden Verfahren ermittelten Meßwerte stimmten gut überein:

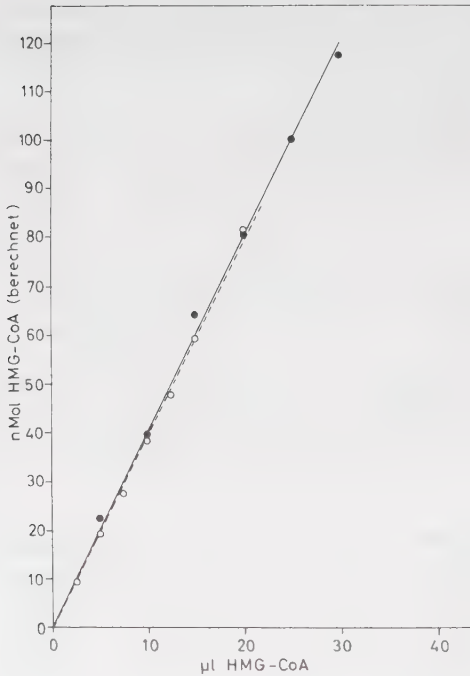


Abb. 3: Vergleich des im optischen Test mit der HMG-CoA-Lyase- und der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion ermittelten Gehaltes der HMG-CoA-Eichlösung.

o----o HMG-CoA-Reduktase, ●—● HMG-CoA-Lyase, Exptl. Einzelheiten s. S. 57 .

Der Berechnung des Gehaltes der zum radiochemischen HMG-CoA-Test verwendeten Eichlösung wurden wegen der größeren Genauigkeit jedoch nur die mit der HMG-CoA-Reduktase gewonnenen Extinktionswerte zugrundegelegt.

2.2. Reinheit der HMG-CoA-Reduktase

Untersuchungen hinsichtlich der Reinheit der HMG-CoA-Reduktase zeigten, daß unter den Testbedingungen die Aktivität des Präparates an unspezifischem NADPH-Verbrauch nur etwa 1 - 2 % der Reduktase-Aktivität betrug. In Abwesenheit von NADPH wurde HMG-CoA vom Enzym nicht angegriffen: Inkubierte man HMG-CoA mit der Reduktase vor und startete die Mevalonatbildung nach verschiedenen Zeiten mit NADPH, dann blieb der NADPH-Verbrauch bis zu einer Vorinkubationsdauer von 10 min., einem Zeitraum, der gewöhnlich zum vollständigen Substratumsatz in der Reduktase-Reaktion ausreichte, konstant:

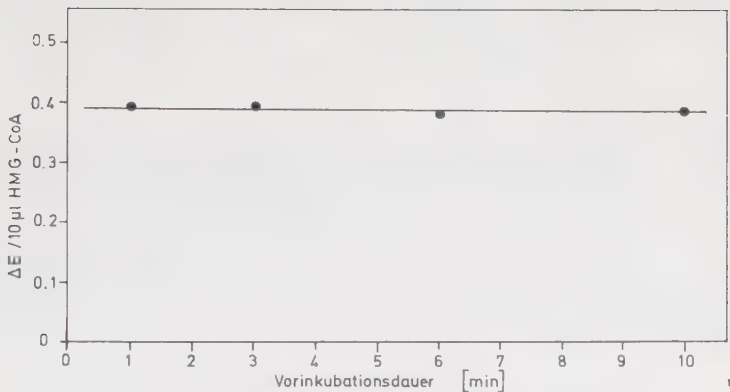


Abb. 4: Abhängigkeit des NADPH-Verbrauchs in der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion von der Vorinkubationsdauer der HMG-CoA-Eichlösung mit der HMG-CoA-Reduktase aus Bäckerhefe. (V = 1.00 ml, d = 1.00 cm, λ = 334 nm, T = 25° C). Exptl. Daten s. S. 57 .

Um weiterhin sicherzustellen, daß nicht eventuell auch Acetoacetyl-CoA und Acetyl-CoA aus dem Leberextrakt über ein HMG-CoA-synthetisierendes Enzymsystem miterfaßt wurden, wurden Acetoacetyl-CoA, Acetyl-CoA und NADPH in der Meßküvette gemischt. Nach Zugabe der HMG-CoA-Reduktase trat keine Enzymreaktion auf:

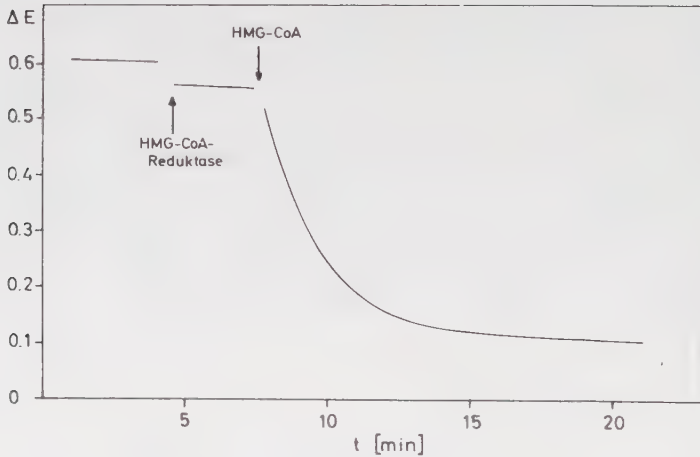


Abb. 5: Untersuchung der HMG-CoA-Reduktase-Präparation aus Bäckerhefe auf HMG-CoA-Synthase-Aktivität unter den Bedingungen des HMG-CoA-Tests. Konzentration der Inkubation an Acetoacetyl-CoA 0.20 mM, an Acetyl-CoA 0.30 mM. ($V = 1.0$ ml, $d = 1.00$ cm, $\lambda = 334$ nm, $T = 25^{\circ}$ C). Weitere exptl. Bedingungen s. S. 58 .

Die Anwesenheit einer Mevalonatkinase konnte ebenfalls ausgeschlossen werden; dies war insofern von Bedeutung, als im radiochemischen Test mit der Zugabe der NADPH-Lösung auch ATP in die Inkubation gelangte. HMG-CoA-Reduktase wurde mit Mevalonat und ATP in der Küvette gemischt; im gekoppelten Test mit PEP, Pyruvat-Kinase, NADH und Lactatdehydrogenase war keine ADP-Bildung festzustellen:

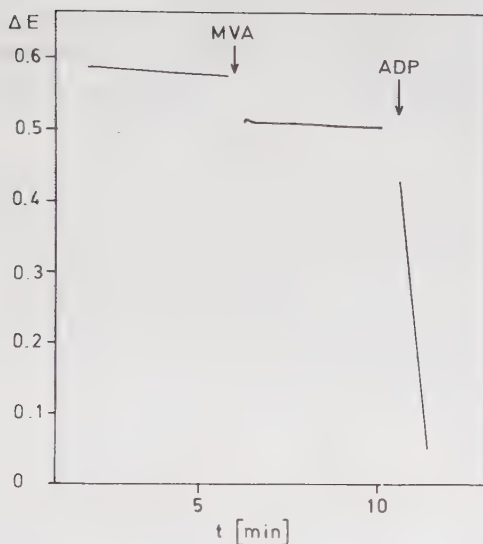


Abb. 6: Untersuchung der HMG-CoA-Reduktase-Präparation aus Bäckerhefe auf Mevalonat-Kinase-Aktivität. Konzentration der Vormischung an ATP 0.20 mM; Konzentration der Inkubation an Mevalonat nach der MVA-Zugabe 1.00 mM. ($V = 1.00$ ml, $d = 1.00$ cm, $\lambda = 334$ nm, $T = 25^{\circ}$ C).

Als nachteilig erwies sich lediglich die geringe Stabilität der HMG-CoA-Reduktase unter den in der Literatur angegebenen Aufbewahrungsbedingungen. Die Halbwertszeit des Enzyms betrug etwa eine Woche. Aus diesem Grunde wurde das Enzym für jede Testserie erneut angereichert und innerhalb weniger Tage verbraucht.

2.3. Darstellung von (4R)-4-³H-NADPH

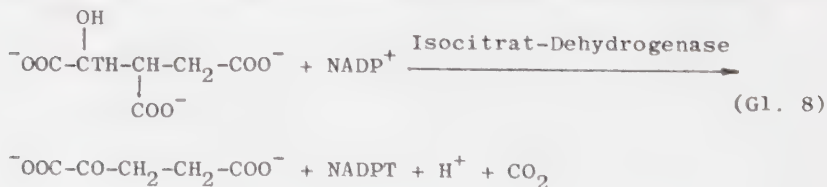
Wie Dugan und Porter nachwiesen, wird bei der enzymatisch hydrierenden Esterspaltung des HMG-CoA der Wasserstoff spezifisch von der A-Seite (= 4R-Seite) des NADPH auf das Substrat übertragen(53). (s. jedoch Kap. 2.5.2.). Für das HMG-CoA-Bestimmungsverfahren mußte somit das NADPH auf dieser Seite tritiiert sein.

Tritiiertes NADPH kann entweder auf rein chemischem Wege dargestellt oder durch Kombination nichtenzymatischer Synthesen mit enzymatischen Umsetzungen gewonnen werden.

Für den ersten Fall ist in der Literatur die Reduktion von NADP^+ mit $^3\text{H-NaBH}_4$ beschrieben (54). Mit dieser Methode läßt sich zwar tritiiertes NADPH von außerordentlich hoher spezifischer Radioaktivität gewinnen, doch erfolgt der Tritiumeinbau nicht stereoselektiv in bezug auf die 4-Position des NADPH.

Für den zweiten Weg lassen sich prinzipiell zwei Möglichkeiten unterscheiden; beidesmal entsteht durch die Verwendung enzymatischer Reduktionsreaktionen streng seitenspezifisch tritiiertes NADPH:

- a) Tritium wird in einer Dehydrogenase-Reaktion der erforderlichen Seitenspezifität von einem tritiierten Substrat auf NADP^+ übertragen. Das Gleichgewicht dieser Reaktion sollte dabei möglichst vollständig auf der Seite der NADPH-Bildung liegen. Für die Darstellung von (4R)-4-³H-NADPH erfüllt die Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion diese Voraussetzungen (55):



Enzymatisch aktives threo-d-2-³H-Isocitrat kann durch chemische Synthese hergestellt werden (56).

- b) In einer Dehydrogenase-Reaktion entgegengesetzter Seitenspezifität wird 4-³H-NADP⁺ (das z.B. nach San Pietro durch Inkubation von NADP⁺ mit ³H₂O in Gegenwart von CN⁻ gewonnen werden kann (57) reduziert. Für die Darstellung von A-Seiten-tritiertem NADPH ist die B-seitenspezifische Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion geeignet (58). Die NADPH-Bildung ist unter den Testbedingungen irreversibel, da das entstehende Gluconat-6-Phosphat innerhalb weniger Minuten aus dem Lacton in die enzymatisch inaktive, nichtzyklische Form übergeht (59).

Bei der Wahl der für den HMG-CoA-Test geeignetsten Herstellungsmethode mußte zusätzlich berücksichtigt werden, daß Arbeiten mit radioaktivem Material aufgrund der Laborausstattung nur in begrenztem Umfang, d.h. mit Tritium maximal im Bereich von 10-100 mCi durchführbar waren; weiterhin sollte die Synthese des tritierten NADPH wegen seiner Labilität unmittelbar vor jedem Test erfolgen können.

Weder tritiertes Isocitrat noch tritiertes NADP⁺ waren kommerziell erhältlich. Die Darstellung von 2-³H-Isocitrat nach (56) und von 4-³H-NADP⁺ nach (57) mit einer ausreichenden spezifischen Radioaktivität hätte aber den Einsatz von mehreren Ci Tritium erforderlich gemacht (56,60). Die Darstellung von (4RS)-4-³H-NADPH mit ³H-NaBH₄ wurde wegen des unspezifischen Tritumeinbaues in 4-Stellung nur als ultima ratio betrachtet.

Zur Lösung dieser Probleme führte schließlich die Umsetzung von käuflichem 4-³H-NAD⁺ mit ATP in Gegenwart von NAD-Kinase zu 4-³H-NADP⁺ (61). Letzteres konnte anschließend mit G-6-P und G-6-P-Dehydrogenase zu (4R)-4-³H-NADPH reduziert werden. Dieses Verfahren wies mehrere Vorteile auf: Einmal war die spezifische Radioaktivität des tritierten NAD⁺ mit 50 mCi/mMol so hoch, daß es für die Testzwecke mit nichtradioaktivem NAD⁺ etwa 20-fach verdünnt werden konnte, weiterhin waren für die Synthese des NADPH nur zwei einfache enzymatische Umsetzungen erforderlich, und schließlich erübrigte sich auch die Isolation des Produktes aus der Inkubation, da diese keine Substanzen

enthielt, die den radiochemischen HMG-CoA-Test beeinträchtigt hätten. Aliquote der NADPH-Inkubation wurden nach Denaturierung der darin enthaltenen Enzyme als gebrauchsfertige (4R)-4-³H-NADPH-Lösung im Test eingesetzt.

Die Inkubationsbedingungen für die enzymatische Umsetzung von 4-³H-NAD⁺ konnten so gewählt werden, daß die Durchführung beider Syntheseschritte in einem gemeinsamen Reaktionsansatz möglich war. Da aber die Kinasereaktion wesentlich langsamer ablief als die NADP⁺-Reduktion mit G-6-P-Dehydrogenase, erfolgte der Start der Reduktionsreaktion wegen der Labilität des NADPH erst kurz vor dem Abschluß der gesamten Umsetzung. An nichtradioaktivem Material wurden in Vorversuchen Verlauf und Ausbeute beider Teilreaktionen untersucht. Das eingesetzte NAD⁺ konnte mit ATP praktisch vollständig in NADP⁺ überführt werden:

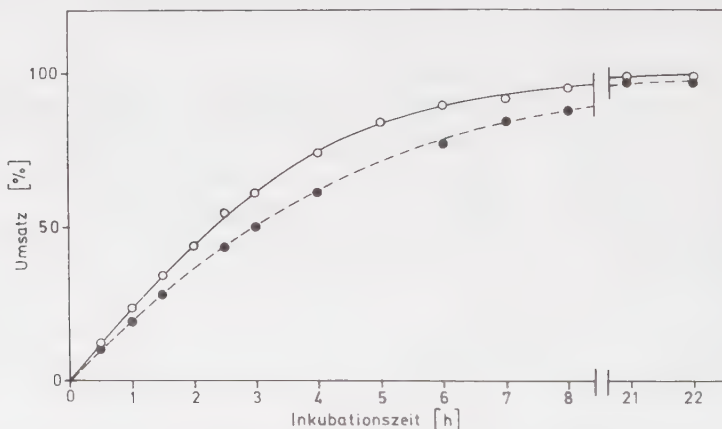


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Synthese von NADP⁺ aus NAD⁺ und ATP.

Konzentration der Inkubation an NAD⁺ 2.69 mM. ●----● zweifacher, o—o dreifacher ATP-Überschuß. (V= 1.56 ml, pH = 7.5, T = 37° C; Test auf NADP⁺ mit G-6-P-Dehydrogenase, S.59).

Die Ausbeute der NADP^+ -Reduktion erreichte dagegen trotz eines dreifachen G-6-P-Überschusses nur 73 % des theoretischen Wertes:

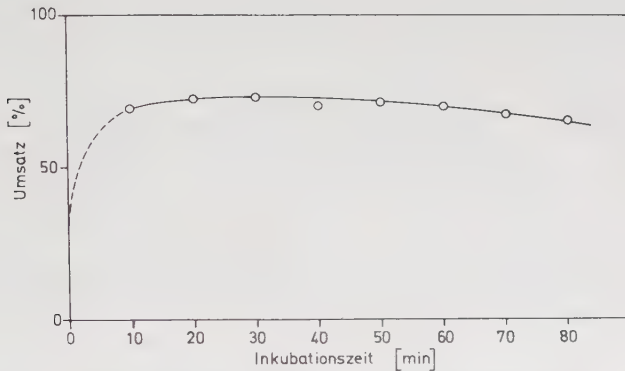


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen NADPH-Synthese aus NADP^+ und G-6-P bei dreifachem G-6-P-Überschuß. Konzentration der Inkubation an $\text{NADP}^+ = 2,1 \text{ mM}$. ($V=4.00 \text{ ml}$, $\text{pH} = 8.0$, $T = 25^\circ \text{ C}$; Test auf NADPH mit Glutamat-Dehydrogenase, s.S. 60).

Vor dem Einsatz der Coenzymlösung im optischen Test mußte die G-6-P-Dehydrogenase durch dreiminütiges Erhitzen der Mischung auf 85° zerstört werden. Es war anzunehmen, daß dabei auch ein Teil des empfindlichen NADPH vernichtet wurde. Da in der Kinase-Reaktion und in der G-6-P-Dehydrogenase-Reaktion pro Mol gebildeten Coenzym jeweils ein Mol Protonen freigesetzt werden, erniedrigt sich der pH-Wert der Inkubation während der Umsetzung leicht. Da aber die Stabilität des NADPH in alkalischen Lösungen wesentlich größer ist als in sauren, mußte sich die NADPH-Zersetzung im Hitzeschritt in Grenzen halten lassen, wenn die Inkubation zu Beginn der NADPH-Bildung mit NaOH auf etwa pH 8 eingestellt wurde. Wie Abb. 9 zeigt, werden bei diesem pH-Wert nach dreiminütigem Erhitzen nur zwei Prozent des Coenzym zerstört:

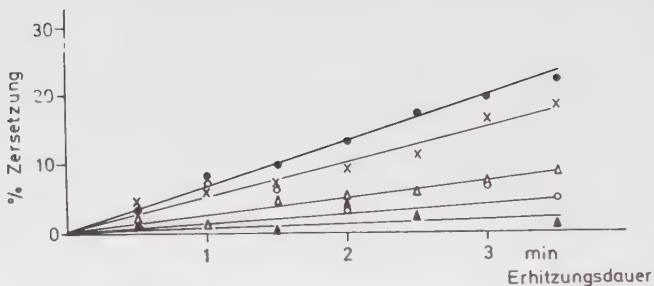


Abb. 9: Abhängigkeit des Zersetzungsgrades von NADPH-Lösungen verschiedener pH-Werte von der Dauer der Erhitzung auf 85° C.

●—● pH 7.0, x—x pH 7.25, Δ—Δ pH 7.5, o—o pH 7.75, ▲—▲ pH 8.0.

Üblicherweise wurden alle NADPH-Inkubationen mit NaOH auf pH 8 eingestellt; der unvollständige Ablauf der Synthese mußte somit andere Ursachen haben.

Hinweise auf eventuelle Inhibitoreigenschaften der einzelnen Reaktionspartner der Inkubationsmischung wie ATP, ADP, Puffer, G-6-P usw. auf die NADPH-Bildung konnten jedoch nicht erhalten werden. Eine endgültige Klärung des Problems muß vorerst dahingestellt bleiben.

Für die Testzwecke genügte eine Ausbeute von 73 % vollauf; sie wäre keinesfalls durch die Anwendung von Methoden zur Synthese von tritiiertem NADPH erreichbar gewesen, die eine Isolation des Coenzyms aus dem Syntheseansatz erforderlich gemacht hätten.

In der endgültigen Form des Darstellungsverfahrens für (4R)-4-³H-NADPH wurde zuerst die Kinase-Reaktion und nach 22^h die G-6-P-Dehydrogenase-Reaktion gestartet. Die Umsetzung wurde nach insgesamt 23^h abgestoppt und das radioaktive NADPH gleich im Anschluß daran innerhalb einer Stunde im Test eingesetzt und verbraucht.

2.4 Bildung von tritiiertem Mevalonat bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4-³H-NADPH

Die Brauchbarkeit der radiochemischen HMG-CoA-Bestimmungsmethode hing ganz entscheidend vom Ausmaß des Tritiumeinbaues in das Mevalonat bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit tritiiertem NADPH ab. Zur Klärung dieser Frage mußte ein geeignetes Reinigungsverfahren für das enzymatisch gebildete radioaktive Mevalonat zur Verfügung stehen.

4-³H-NAD⁺ wurde mit nichtradioaktivem NAD⁺ auf eine spezifische Radioaktivität von 2.38 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ (= 5,280 dpm/nMol) verdünnt. Selbst unter der ungünstigen Annahme, daß nur die Hälfte des im NAD⁺ enthaltenen Tritiums nach der NADPH-Bildung enzymatisch nutzbar blieb, mußten sich damit bei einem Einbau von 2 Mol ³H/Mol HMG-CoA noch HMG-CoA-Mengen unter 1 nMol mit der Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie erfassen lassen.

In einem ersten Vorversuch wurden mit tritiiertem NADPH und HMG-CoA-Reduktase Inkubationen mit und ohne HMG-CoA-Zusatz hergestellt. Nach der Trocknung der Proben über P₂O₅ im Vakuumexsikkator wurde das Mevalonat als Lacton unter Zusatz von nichtradioaktivem Träger-Mevalolacton durch eine Na₂SO₄-Extraktion mit Äther isoliert. Die Bestimmung der Radioaktivität der Extraktionsrückstände ergab folgende Werte:

Tab. 1: Vorreinigung des bei der Reduktion von HMG-CoA mit tritiiertem NADPH gebildeten radioaktiven Mevalonats als Lacton durch Ätherextraktion nach (51,23).

Probe	(4R)-4- ³ H-NADPH (nMol)	HMG-CoA (nMol)	Tritiumgehalt (cpm)
1	60	0	20,397
2	60	0	26,350
3	60	185	55,992
4	60	185	54,341

Um entscheiden zu können, ob der gemäß Tab. 1 höhere Tritiumgehalt der Extrakte aus den Proben mit HMG-CoA-Zusatz vom Mevalolacton herrührte, mußte eine vollständige Abtrennung der radioaktiven Begleitsubstanzen gelingen, was mit einer einfachen Ätherextraktion nicht möglich war. In Anbetracht der geringen Substanzmengen kam für eine weitergehende Reinigung der Ätherextrakte in erster Linie ein chromatographisches Verfahren in Frage.

Eine radiogaschromatographische Isolierungs- und Bestimmungsmethode analog der von Hamprecht beschriebenen (23) schied wegen der geringen Zählausbeute für Tritium mit 4-8 % in der Durchflußzelle aus. Geeignet erschien dagegen die Dünnschichtchromatographie nach (53): Die Rückstände der Ätherextraktionen zweier weiterer Inkubationen mit und ohne HMG-CoA-Zusatz wurden in wenig Aceton aufgenommen, auf eine Kieselgelplatte punktförmig aufgetragen und mit dem Laufmittel Aceton/Benzol = 1 : 1 chromatographiert. Die Kieselgelschicht wurde anschließend unter dem Dünnschichtscanner auf Radioaktivität untersucht. Wie Abb. 10 zeigt, war nur beim Extrakt der HMG-CoA-haltigen Probe ein Radioaktivitätsfleck an der Stelle nachweisbar, wo entsprechend der Literaturangabe Mevalolacton erscheinen mußte.

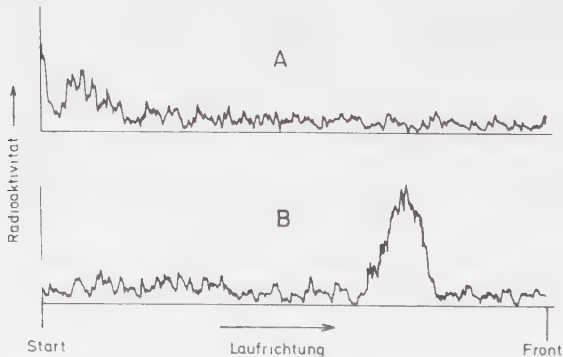


Abb. 10: Dünnschichtchromatographische Reinigung des bei der Reduktion von HMG-CoA mit tritiiertem VADPH gebildeten radioaktiven Mevalonats als Lacton. A: Extrakt einer Reduktase-Inkubation ohne HMG-CoA-Zusatz, B: mit HMG-CoA-Zusatz.

Schicht: Kieselgel auf Alufolie, Laufmittel Aceton/Benzol = 1 : 1, Laufstrecke 17.0 cm.

Die geringe Abweichung des R_f -Wertes des Radioaktivitätsgipfels von dem in der Literatur angegebenen Wert für Mevalolacton (0.56 - 0.58) ist auf Unterschiede in der Beschaffenheit der Kieselgelschicht zurückzuführen.

Die Schicht der betreffenden Stellen wurde abgelöst, mit Äther extrahiert und der Rückstand des Ätherextraktes auf den Tritiumgehalt hin untersucht:

Tab. 2: Tritiumgehalt des dünnsschichtchromatographisch gereinigten Mevalolactons

Probe	(4R)-4- ³ H-NADPH (nMol)	HMG-CoA (nMol)	Tritiumgehalt (cpm)
1	60	0	219
2	60	185	9,656

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, war mit der Dünnschichtchromatographie eine erste Methode gefunden, die eine zufriedenstellende Reinigung und auch einen schlüssigen Identitätsbeweis für das tritiierte Mevalolacton aus der Enzyminkubation gestatete. Setzte man der Inkubation vor Beginn der Aufarbeitung noch eine bekannte Menge ¹⁴C-Mevalonats zu, so konnte mit Hilfe der Bestimmung der nach der Reinigung noch übriggebliebenen ¹⁴C-Impulse die Extraktionsausbeute berechnet und der absolute Tritiumeinbau im Mevalonat ermittelt werden. Für diesen Zweck wurde das Szintillationsspektrometer in Doppelmarkierungseinstellung verwendet und anhand von Quenchkorrekturkurven geeicht.

Die dünnsschichtchromatographische Reinigung des MVL fand für die ersten HMG-CoA-Bestimmungsversuche in Rattenlebern routinemäßig statt. ¹⁴C- und ³H-Impulse erschienen auf der Dünnschicht in einer gemeinsamen Bande, was als endgültiger Beweis für die Identität des enzymatisch gebildeten, tritiierten Mevalonats gewertet wurde:

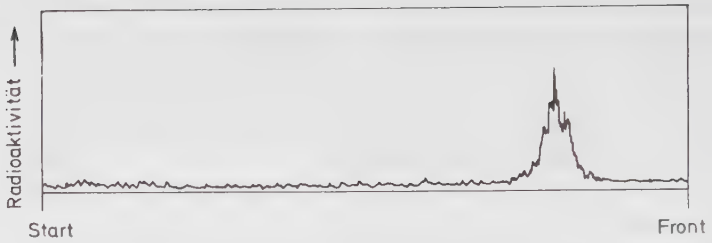


Abb. 11: Lage der Bande des ^{14}C - und ^3H -Mevalolactons bei der dünnenschichtchromatographischen Reinigung des radioaktiven Mevalonats im HMG-CoA-Test.

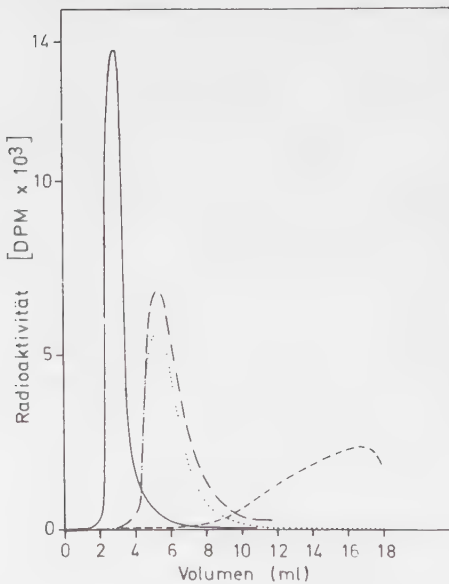


Abb. 12: Säulenchromatographie des Mevalolactons

Säule: 5.5 x 70 mm, Füllung: mit dem jeweiligen Elutionsmittel äquilibriumiertes Kieselgel 60, 120 - 230 mesh, MERCK.
Elutionsmittel: ——— EtOAc/EtOH = 9 : 1, - - - - EtOAc/Benzol = 9 : 1, - - - - EtOAc/Benzol = 1 : 1, EtOAc.

Die vollständige Reinigung des MVL nach der Ätherextraktion der das radioaktive MVL enthaltenden Kieselgelschicht führte zu einer Gesamtextraktionsausbeute von durchschnittlich 50 % nach den wiedergefundenen ^{14}C -Impulsen.

Im Verlauf der Arbeit zeigte es sich jedoch, daß der für die Durchführung der Dünnschichtchromatographie benötigte Zeitaufwand die Auswertung eines HMG-CoA-Tests erheblich verzögerte. Aus diesem Grunde wurden Versuche unternommen, die Reinigung des Mevalolactons von der Kieselgelschicht auf ein entsprechendes säulenchromatographisches Verfahren zu übertragen. Für Untersuchungen in dieser Richtung wurde aus ^{14}C -Mevalonat hergestelltes Lacton an kleinen Kieselgelsäulen in Pasteurpipetten mit polaren organischen Lösungsmitteln chromatographiert. Dabei erwiesen sich in erster Linie Laufmittelsysteme mit Essigsäureäthylester als Hauptbestandteil als besonders geeignet; am einfachsten schien es, ausschließlich Essigester zu verwenden (Abb. 12).

Die Wiedergewinnung des MVL war praktisch vollständig; es blieb nur noch zu klären, ob die Säule bei diesem Verfahren analog der Dünnschichtchromatographie die radioaktiven Begleitsubstanzen einer HMG-CoA-Inkubation mit tritiiertem NADPH zurückhielt. Es wurden daher wieder HMG-CoA-Inkubationen mit radioaktivem NADPH hergestellt und nach Zusatz von ^{14}C -MVA in der üblichen Weise extrahiert. Die Rückstände der Ätherextrakte wurden auf Kieselgelsäuren, die mit Essigsäureäthylester äquilibriert worden waren, aufgetragen und mit Essigester eluiert.

Bei den Proben ohne HMG-CoA-Zusatz erschien in den Fraktionen, die die ^{14}C -Impulse des Träger-Mevalolactons enthielten, kein Tritium; bei der Chromatographie der Extrakte aus den Proben mit HMG-CoA-Zusatz verliefen ^{14}C - und ^3H -Radioaktivität genau parallel:

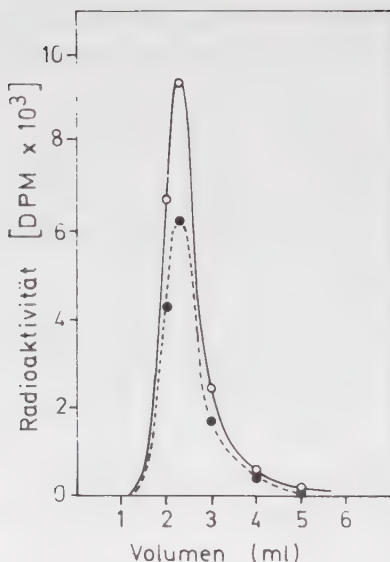


Abb. 13: Säulenchromatographische Reinigung des radioaktiven Mevalolactons im HMG-CoA-Test.

o—o ^{14}C -MVL, ●—● ^3H -MVL. Säule: 5.5 x 20 mm; Füllung: mit Essigsäureäthylester äquilibriertes Kieselgel 60, 120 - 230 mesh. Elutionsmittel: Essigsäureäthylester.

Die Wiederfindungsrate der ^{14}C -Impulse betrug nach vollständiger Reinigung des Mevalolactons durchschnittlich 85 %, wenn die ersten 4 ml gemeinsam aufgefangen und nach Zusatz von Szintillationslösung ausgezählt wurden. Mit dieser Methode konnte die Dünnschichtchromatographie ersetzt werden; die säulenchromatographische Reinigung des radioaktiven MVL erwies sich in der Folgezeit als absolut zuverlässig und erbrachte einen wesentlichen Zeitgewinn für den radiochemischen HMG-CoA-Test. Die mit der Dünnschicht- und der Säulenchromatographie gemessenen Tritium-Einbauraten in MVL waren identisch.

2.5. Untersuchungen zum Mechanismus der Tritiumübertragungsreaktion bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4-³H-NADPH

Konnte mit den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Methoden die prinzipielle Anwendbarkeit des radiochemischen Testverfahrens zum Nachweis geringer Mengen von HMG-CoA aufgezeigt werden, so mußte für eine genaue Konzentrationsbestimmung dieses Metaboliten im Lebergewebe nur noch die geforderte Proportionalität zwischen dem Tritiumeinbau in das Mevalonat und dem Substratumsatz bei entsprechendem Überschuß an radioaktivem NADPH gewährleistet sein. Im Grunde genommen genügte für die Testzwecke eine einfache Proportionalität ohne Rücksicht darauf, ob die Tritiumübertragung vom NADPH auf das Substrat stöchiometrisch erfolgte oder nicht, da für jede Bestimmung eine Eichung mit synthetischem HMG-CoA vorgenommen wurde.

Vom enzymchemischen Standpunkt aus war es jedoch interessant, zu erfahren, ob entsprechend der Reaktionsgleichung der HMG-CoA-Reduktion Tritium in beiden Teilschritten des enzymatischen Umsatzes von HMG-CoA zu Mevalonat (s. Einleitung) direkt vom NADPH auf das jeweilige Substrat, d.h. HMG-CoA und Mevalonsäure-Coenzym A-thiohemiaceat, übertragen wird. Danach hätte die spezifische Radioaktivität des gebildeten Mevalonats genau doppelt so groß sein müssen wie diejenige des tritiierten NADPH in 4-Stellung.

Aufgrund der Herstellungsmethode ist das 4-³H-NAD⁺ als Ausgangssubstanz für die Darstellung von (4R)-4-³H-NADPH zusätzlich in geringerem Ausmaß auch in 2-Position isotopenmarkiert, so daß dessen spezifische Radioaktivität nicht als genaues Maß für den enzymatisch verwertbaren Tritiumgehalt gelten kann.

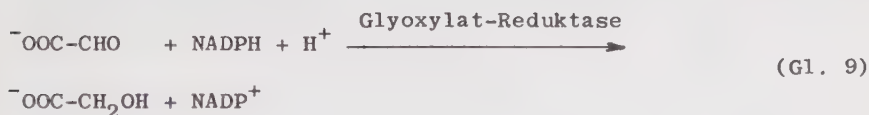
Um aber die Frage nach der Stöchiometrie der Tritiumübertragung bei der Reduktion von HMG-CoA beantworten zu können, bot sich die Möglichkeit an, parallel zur HMG-CoA-Reduktase-Reaktion den enzymatisch aktiven Tritiumanteil des $(4R)-4-^3H-NADPH$ mit einer zusätzlichen A-spezifischen Reduktase- bzw. Dehydrogenase-Reaktion, bei der nur 1 Mol NADPH/Mol Substrat verbraucht wird und deren Gleichgewicht vollständig auf der Seite des Produkts liegt, zu bestimmen. Im Idealfall sollte der spezifische Tritiumgehalt des Produkts dieser Umsetzung genau halb so groß sein wie der des aus HMG-CoA gebildeten Mevalonats. Außerdem sollte, wenn die eingesetzte NADPH-Menge den limitierenden Faktor für den Substratumsatz darstellte, der erzielte Gesamt-Tritiumeinbau in beiden Reaktionen gleich groß und Ausdruck des gesamten enzymatisch nutzbaren Tritiumgehalts des Coenzyms sein. Es muß jedoch betont werden, daß bei diesen Annahmen ein möglicher Einfluß eines Isotopeneffektes des Tritiums auf den Reaktionsverlauf außer acht gelassen wurde.

Die Problematik solcher Isotopeneffekte in der Biochemie, insbesondere des radioaktiven Wasserstoffs bei Dehydrogenase-Reaktionen, wurde eingehend von Simon und Palm beschrieben und diskutiert (62,63). Prinzipiell werden primäre und sekundäre Isotopeneffekte unterschieden, wobei unter dem kinetischen Isotopeneffekt der Quotient der Gleichgewichtskonstanten der Besetzung des Grund- und Übergangszustandes für die nichtmarkierte und die markierte Verbindung verstanden wird. Primäre Isotopeneffekte treten auf, wenn die Bindung des fraglichen Isotops im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion gelöst wird; wird diese Bindung nicht im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gelöst oder übt das Isotop nur aufgrund eines Substituenteneffektes einen Einfluß auf den Reaktionsablauf aus, so sind sekundäre Isotopeneffekte die Folge. Wegen der größeren Masse des Tritiums gegenüber dem Wasserstoff ist die Nullpunktenergie der Bindung C-T niedriger als die der Bindung C-H; daraus resultiert ein geringerer Kernabstand und eine festere kovalente Bindung. Die primären Isotopeneffekte des Tritiums sind immer >1 und größer als die sekundären Isotopeneffekte; letztere können sogar invers, d.h. <1 sein, wenn sie auf Substituenteneffekten des Tritiums beruhen.

Für Tritium wurden bei einigen Alkoholdehydrogenasen die primären Isotopeneffekte zu 4.1 - 6.8, die sekundären zu 1.4 - 1.6 bestimmt (63).

2.5.1. Die enzymatische Glyoxylat-Reduktion als Vergleichsreaktion

Krakow et al. (64) beschrieben 1963 die Anreicherung einer NADPH-abhängigen Glyoxylat-Reduktase aus Erbsen und berichteten über die A-Seiten-Spezifität dieses Enzyms. Da das Gleichgewicht der Reaktion



praktisch vollständig auf der Seite des Glykolats liegt, erschien diese Enzymreaktion zum Vergleich der Tritiumübertragung von (4R)-4-³H-NADPH mit der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion geeignet.

Dabei zeigte es sich zunächst, daß die Anreicherung der Glyoxylat-Reduktase gemäß der Vorschrift nicht streng reproduzierbar war. Insbesondere ging der (NH₄)₂SO₄-Niederschlag schon nach der dritten Fraktion der Phosphatpuffer-Extraktion ohne Rückstand als schleimartige Masse in Lösung. Große Mengen einer Glyoxylat-reduzierenden Enzymaktivität waren in allen drei Fraktionen vorhanden. Das durch Reduktion von Glyoxylat mit (4R)-4-³H-NADPH und der "Glyoxylat-Reduktase" aus Fraktion 2 gewonnene Glykolat wurde sowohl über eine Ionenaustauschersäule als auch durch die Darstellung des S-Benzyl-thiuroniumsalzes der Glykolsäure isoliert und gereinigt. In beiden Fällen konnte selbst bei vollständigem Umsatz des NADPH nur ein verschwindend kleiner Tritiumeinbau festgestellt werden.

Es lag der Verdacht nahe, daß es sich bei dem aus Erbsen angereicherten, Glyoxylat-reduzierenden Enzym um eine B-Seiten-spezifische Reduktase handelte. Zur Klärung dieser Frage wurden nebeneinander enzymatische Glyoxylat-Reduktionen mit A- und

B-Seiten-tritiiertem NADPH ausgeführt. (4S)-4-³H-NADPH wurde dazu aus 4-³H-NADP⁺ mit Hilfe der Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion hergestellt.

Wie Abb. 14 zeigt, war der Verdacht gerechtfertigt:

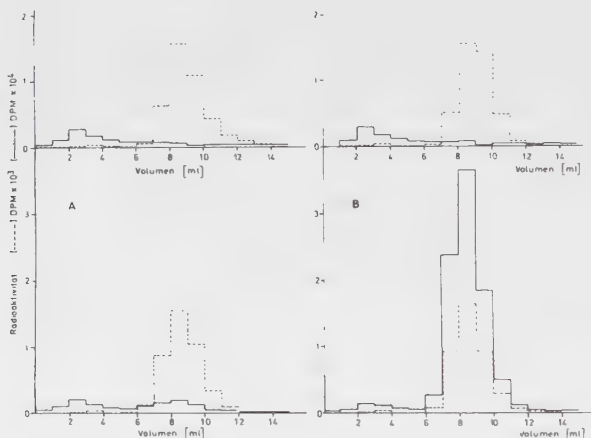
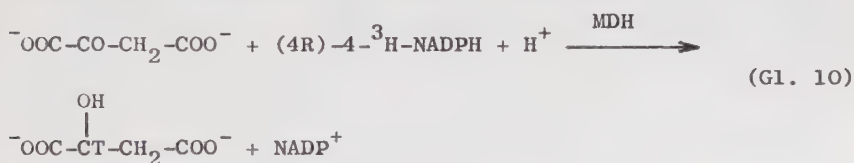


Abb. 14: Seitenspezifität der Glyoxylat-Reduktase aus Erbsen: Ionenaustauschchromatographie der enzymatisch mit tritiiertem NADPH aus Glyoxylat gebildeten Glykolsäure. ——— ³H-Impulse, - - - - - ¹⁴C-Träger-Glykolsäure. Teil A mit A-³H-NADPH, Teil B mit B-³H-NADPH; darüber jeweils die Chromatographie von Referenzproben ohne Glyoxylat-Zusatz. Exptl. Einzelheiten S. 65.

Wie aus der Abbildung weiter ersichtlich ist, hatte auch eine geringe, aber signifikante Tritiumübertragung von der A-Seite des NADPH auf das Substrat stattgefunden. Ob das aus Erbsen angereicherte, Glyoxylat-reduzierende Enzym mit der von Krakow et al. beschriebenen Glyoxylat-Reduktase identisch ist, muß wegen des problematischen Anreicherungsanges dahingestellt bleiben. Die Glyoxylat-Reduktion schied als Vergleichsreaktion mit der HMG-CoA-Reduktion wegen der B-Spezifität der Glyoxylatreduktase aus.

2.5.2. Die enzymatische Oxalacetat-Reduktion als Vergleichs- reaktion

Johnson und Hatch (65) beschrieben die Anreicherung einer NADP^+ -spezifischen Malatdehydrogenase aus Maisblättern, die nach Davies et al. (66) den Wasserstoff von der A-Seite des NADPH auf das Substrat, Oxalacetat, überträgt:



Da auch bei dieser Reaktion unter den Testbedingungen das Gleichgewicht weit auf der Seite des Malats liegt, konnte sie als gleichwertiger Ersatz für die Glyoxylat-Reduktion zum Vergleich mit der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion herangezogen werden.

Die Anreicherung der NADP^+ -spezifischen Malatdehydrogenase aus Maisblättern war gemäß der Literaturvorschrift ohne Schwierigkeiten nachvollziehbar.

Oxalacetat wurde mit $(4\text{R})\text{-4-}^3\text{H-NADPH}$ und der MDH inkubiert. Die Mischung wurde nach beendetem Substratumsatz auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex 1 x 8, Formiat-Form) aufgetragen und mit 1 N Ameisensäure nach gründlichem Waschen eluiert. In den Fraktionen des Eluats, in denen nach Vorversuchen Äpfelsäure erscheinen mußte, konnte ein hoher Tritiumgehalt gemessen werden:

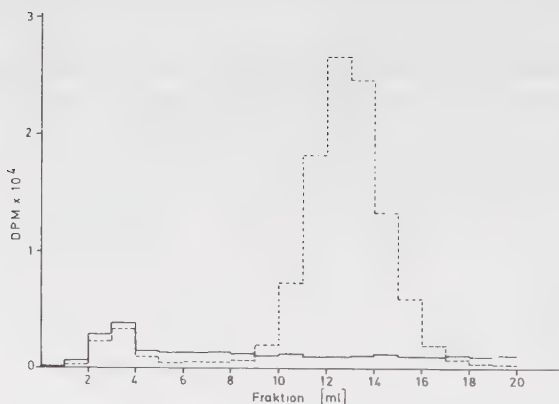


Abb. 15: Ionenaustauschchromatographie der enzymatisch mit (4R)-4-³H-NADPH aus Oxalacetat gebildeten Äpfelsäure. ----- mit Oxalacetat, ——— Referenzprobe ohne Oxalacetatzusatz. Exptl. Einzelheiten s. S. 67 (Säule 7 x 40 mm).

Zur vollständigen Abtrennung der radioaktiven Äpfelsäure von tritiumhaltigen Begleitsubstanzen wurde die chromatographisch vorgereinigte Äpfelsäure nach Entfernung der Ameisensäure in Wasser gelöst und erneut einer Ionenaustauschchromatographie unter den gleichen Bedingungen unterworfen (s. experimenteller Teil).

Um die Isolationsausbeute an Malat bestimmen zu können, wurde wie bei der Reinigung des Mevalonats im HMG-CoA-Test ¹⁴C-Äpfelsäure als Träger zugegeben. Es konnten durchschnittlich 50 % der eingesetzten Menge wiedergewonnen werden.

Für den Parallelversuch der Reduktion von HMG-CoA und Oxalacetat mit tritiiertem NADPH wurden für alle Proben einheitliche Inkubationsbedingungen hergestellt. Da sowohl die HMG-CoA-Reduktase wie auch die Malatdehydrogenase zu einem gewissen - wenn auch unterschiedlichen - Grade eine unspezifische NADPH-Zersetzung in dem Reaktionsansatz verursachten, enthielten alle Vormischungen beide Enzyme in gleicher Aktivität, bezogen

auf den NADPH-Umsatz/Minute. Auf diese Weise war sichergestellt, daß die zum Substratumsatz zur Verfügung stehende NADPH-Menge in allen Proben und zu jedem Zeitpunkt gleich groß war.

Die Auswertung des Parallelversuches führte zu einigen unerwarteten Resultaten:

- a) Die Linearität des Tritiumeinbaues in das Produkt der jeweiligen Reaktion war nur bis zu einem NADPH-Umsatz von etwa 10-20 % der gesamten eingesetzten NADPH-Menge gewährleistet; darüber stieg der Tritiumeinbau überproportional an, bis bei Substratüberschuß das vorgelegte NADPH der limitierende Faktor wurde.
- b) Die Steigung der im Ursprung an beide Kurven angelegten Tangenten verhielt sich nicht wie 2 : 1, sondern ungefähr wie 1.4 : 1.
- c) Bei Überschuß an HMG-CoA und Oxalacetat gegenüber dem radioaktiven NADPH war der maximal erzielbare Tritiumeinbau in die Äpfelsäure wesentlich stärker als in das Mevalonat.

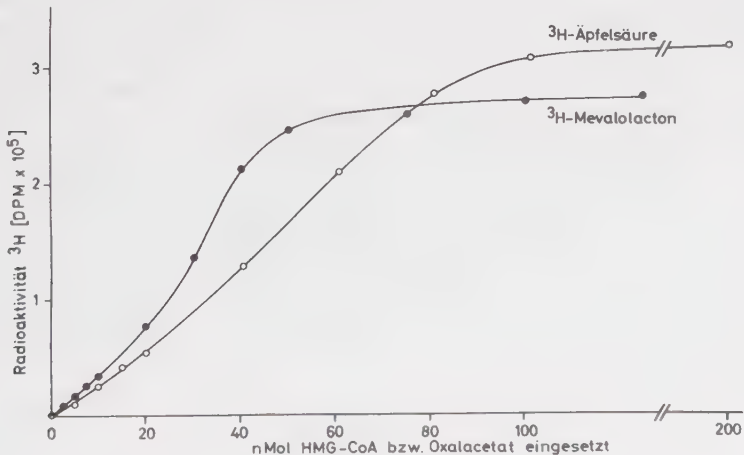


Abb. 16: Vergleich der Tritiumübertragung von (4R)-4- ^3H -NADPH bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA und Oxalacetat.
Zugesetzte NADPH-Menge 70 nMol (5280 dpm ^3H /nMol).

Die Nichtlinearität des Tritiumeinbaues bei steigendem Substratumsatz beruht wohl auf einem Isotopeneffekt des radioaktiven Wasserstoffs. Man sollte vermuten, daß entsprechend dem kinetischen Isotopeneffekt bei der vorliegenden kompetitiven Versuchsführung zunächst bevorzugt nichtradioaktives NADPH umgesetzt wird.

Der Anteil von oxidiertem NADPH zu oxidiertem NADPT sollte nach (62) für $c(\text{Substrat}) \leq 10\% c(\text{NADPH, NADPT})$ konstant und Ausdruck des kinetischen Isotopeneffekts sein, was sich durch die Versuchsergebnisse bestätigen läßt. Bei höheren Substratkonzentrationen müßte sich durch die daraus folgende Anreicherung das Verhältnis $c(\text{NADPT})/c(\text{NADPH})$ zugunsten des radioaktiven Coenzyms verschieben und ein immer stärkerer Tritiumeinbau in das Substrat stattfinden, bis die durch das vorgelegte NADPT insgesamt vorhandene, enzymatisch aktive Tritiummenge erschöpft ist.

Sind die Isotopeneffekte aufgrund unterschiedlicher Reaktionsmechanismen bei beiden Reaktionen für gegen Null gehenden Umsatz nicht identisch, so ließe sich auch zwanglos erklären, warum die Steigungen der im Ursprung an beide Einbaukurven angelegten Tangenten sich nicht wie 2 : 1, sondern nur wie 1.4 : 1 verhalten.

Es wäre verfrüht, anhand der zur Verfügung stehenden Versuchsdaten eingehende quantitative Betrachtungen über die Isotopeneffekte der Oxalacetat-Reduktion und der HMG-CoA-Reduktion mit tritiiertem NADPH anzustellen; geht man aber im Falle der MDH-Reaktion von der Annahme aus, daß die maximal in die Äpfelsäure eingebaute Tritiummenge dem (4R)-Tritiumgehalt der eingesetzten 70 nMol NADPH entspricht, dann kann der Isotopeneffekt für die Tritiumübertragungsreaktion für gegen Null gehenden Oxalacetatumsatz gemäß der Gleichung

$$\left(\frac{N_o}{N_p} \right)_{f \rightarrow 0} = \frac{V \cdot K'_m}{V' \cdot K_m} = I, \quad (\text{Gl. 11})$$

wobei N_o und N_p die spezifischen Aktivitäten des Substrates und des Produktes sind (62), berechnet werden. Aus zwei verschiedenen Einbaustudien wurde für diesen Wert ein Betrag von 1.4 -

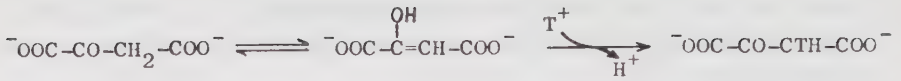
1.3 ermittelt, was dafür spricht, daß ein sekundärer Isotopeneffekt vorliegt und somit die Hydridübertragung bei der enzymatischen Oxalacetat-Reduktion nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

Ähnliche Überlegungen ließen sich - allerdings nur unter größten Vorbehalten, wie weiter unten zu zeigen sein wird - auch für die HMG-CoA-Reduktion anstellen; die nötige Voraussetzung, daß nämlich zwei Mol ^3H /Mol HMG-CoA übertragen werden, wird vom Experiment in erster Linie dadurch gestützt, daß gemäß Abb. 16 das Plateau des maximalen Tritiumeinbaues für die HMG-CoA-Reduktion schon bei etwa 50 nMol, für die Oxalacetat-Reduktion erst bei ungefähr 100 nMol Substratzusatz erreicht wird. Unter dieser Annahme liegt der Isotopeneffekt für die Gesamtreaktion bei mindestens 1.8 - 2.3; eine Entscheidung zugunsten eines primären oder sekundären Isotopeneffekts ist hier nicht eindeutig möglich.

Vorläufig unerklärlich blieb dagegen die Ursache für den gegenüber der HMG-CoA-Reduktion höheren Gesamt-Tritiumeinbau in die Äpfelsäure nach der Oxalacetat-Reduktion trotz gleicher Mengen NADPH als limitierendem Faktor.

Zur Untersuchung dieses Befundes wurden nacheinander folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

- a) NADPH reduziert in einer vorgeschalteten Reaktion zunächst eine Akzeptorgruppe der HMG-CoA-Reduktase (50), die mit dem Inkubationswasser Protonen bzw. $^3\text{H}^+$ -Ionen austauscht; im lyophilisierten Wasser der Reaktionsmischung hätte dann in Abhängigkeit von der umgesetzten HMG-CoA-Menge steigende Tritiumaktivität zu finden sein müssen. Wie Abb. 17 zeigt, war das nicht der Fall;
- b) Da das Inkubationswasser anscheinend immer einen Tritiumgehalt von etwa 20,000 dpm enthielt, wäre die Möglichkeit eines zusätzlichen Tritiumeinbaues in die Äpfelsäure über die Keto-Enol-Tautomerie des Oxalacetates gegeben gewesen:



(Gl. 12)

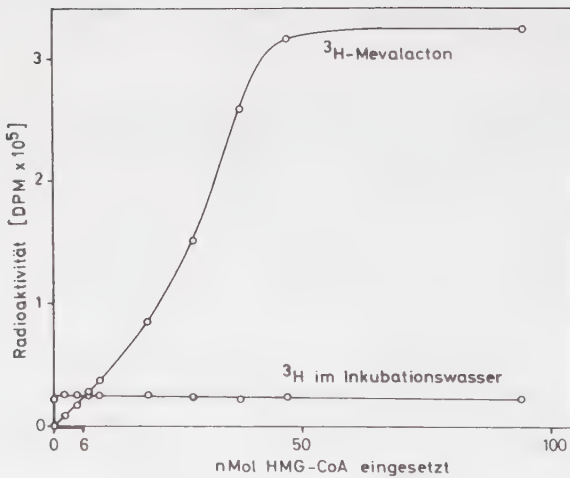


Abb. 17: Abhängigkeit des Tritiumgehaltes im Inkubationswasser vom Umsatz des (4R)-4-³H-NADPH im HMG-CoA-Test.

Zur Prüfung dieser Annahme wurde Oxalacetat mit 20,000 dpm $^3\text{H}_2\text{O}$ 10 min in der Reaktionsmischung vorinkubiert und anschließend mit nichtradioaktivem NADPH reduziert; die entstandene Äpfelsäure war frei von jeder Radioaktivität. Somit kam auch diese Erklärung nicht in Betracht.

- c) Die Versuche mit der Glyoxylat-Reduktase hatten Hinweise dafür geliefert, daß in manchen Fällen ein Substrat den Wasserstoff durchaus sowohl von der A- wie auch von der B-Seite des NADPH - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - übernehmen kann. Da auch Dugan und Porter bei ihren Untersuchungen zur Seitenspezifität der HMG-CoA-Reduktase einen geringen Tritiumeinbau im Mevalonat bei Verwendung von (4S)-4- ^3H -NADPH zur HMG-CoA-Reduktion festgestellt hatten (53), wurden nochmals genaue Studien zur Stereochemie der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion durchgeführt.

Vielleicht wurde in geringerem Ausmaß bei der HMG-CoA-Reduktion auch B-Seiten-Wasserstoff auf das Substrat übertragen; fand dabei die Oxidation eines A-Seiten-tritierten NADPH-Moleküls statt, so ging dessen Tritiumatom der enzymatischen Nutzung verloren. Der im Vergleich zur Äpfelsäure fehlende Anteil des Tritiumeinbaus im Mevalonat sollte dann die Folge der Übertragung von 4S-Wasserstoff sein, was sich leicht mit (4S)-4- ^3H -NADPH nachweisen ließe.

Es wurden aus diesem Grund (4R)- und (4S)-4- ^3H -NADPH hergestellt und ein weiterer Parallelversuch zwischen HMG-CoA- und Oxalacetatreduktion durchgeführt. Die sich dabei ergebenden Resultate entsprachen im wesentlichen den Erwartungen;

Wie Abb. 18 zeigt, ist die Malatdehydrogenase streng spezifisch für die A-Seite des NADPH, während bei der HMG-CoA-Reduktion etwa 7 % des übertragenen Tritiums von der B-Seite des Coenzymstammes stammen.

Zur Deutung dieses überraschenden Ergebnisses könnte man einmal vermuten, daß neben der HMG-CoA-Reduktase ein weiteres in der Präparation vorhandenes Enzym eine B-Seiten-spezifische Reduktion von HMG-CoA bewerkstelligt, zum andern, daß die HMG-CoA-Reduktase selber, sowohl A- wie - in geringerem Maße - auch

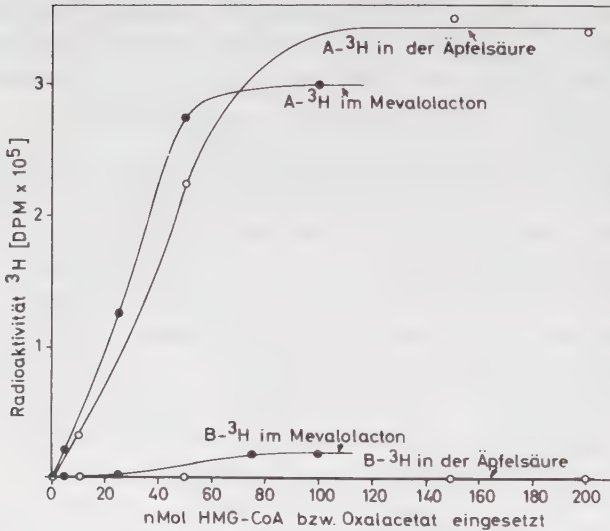


Abb. 18: Seitenspezifität der enzymatischen HMG-CoA- und Oxalacetat-Reduktion in bezug auf die 4-Position des NADPH. Eingesetzte Coenzym-Mengen: A-³H-NADPH 70 nMol, B-³H-NADPH 65 nMol.

B-Wasserstoff übertragen kann. Untersuchungen zu diesem Problem müßten die weitere Reinigung des Enzyms beinhalten; sie konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch zeitmäßig nicht mehr durchgeführt werden.

Mögen diese Details der HMG-CoA-Reduktion auch verblüffend erscheinen, so sind sie doch für die Anwendung des radiochemischen Tests zur HMG-CoA-Bestimmung im Lebergewebe, wie schon erwähnt, ohne Belang, da dieser Test nicht anhand der spezifischen Aktivität des NADPH, sondern derjenigen des gebildeten Mevalonats geeicht wird.

2.6. Gehaltsbestimmung von HMG-CoA in der Rattenleber

Der Gewebeaufschluß der Rattenleber erfolgte im wesentlichen nach der klassischen Methode von Hohorst, Kreutz und Bücher durch Frierstopppfixierung der Leber und anschließende Extraktion mit verdünnter Perchlorsäure (67). Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet; eine vorherige Narkose wurde wegen des möglichen Einflusses verschiedener Betäubungsmittel auf den Stoffwechsel der Tiere (68) nicht durchgeführt. Je nachdem, ob vor der Leberentnahme noch die Gewinnung von Blut zur Ketonkörper-Bestimmung notwendig war oder nicht, verging vom Augenblick der Schlachtung an bis zur Frierstopppfixierung der Leber eine Zeit von etwa 50 bzw. 20 sec. Faupel, Seitz und Tarnowski (69) diskutierten eingehend den Einfluß der Anoxie-Dauer auf Veränderungen im natürlichen Metabolitgehalt der Leber. Sie entwickelten eine Doppelmessermethode, mit der es ihnen gelang, Lebern innerhalb von wenigen Sekunden zu isolieren und zu fixieren. Dabei stellten sie fest, daß manche empfindlichen Metabolite wie AMP, Pyruvat und Oxalacetat schon nach 30 sec. eine vom Ausgangswert ganz erheblich abweichende Konzentration im Gewebe aufweisen, während z.B. der Acetyl-CoA- und UDP-Glucose-Spiegel relativ inert gegen kurzzeitige Anoxie sind.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Doppelmessermethode einzuführen. Wegen großer experimenteller Schwierigkeiten gelangte sie jedoch nicht zur Anwendung. Da andererseits festgestellt wurde, daß die Normalwerte der HMG-CoA-Konzentration der Leber selbst nach einer Anoxiedauer von etwa 80 sec. den nach 20 sec. Schlachtungsdauer gewonnenen entsprachen, wurde die Dekapitationsmethode in diesem Fall als brauchbar angesehen und beibehalten.

Die nächste Frage galt der Stabilität von HMG-CoA gegenüber der Einwirkung von eiskalter 6 %iger Perchlorsäure, wie sie zur Extraktion des Leberpulvers verwendet wurde. Selbst nach einer Einwirkungsdauer von 30 min wurden nur 7 % des eingesetzten HMG-CoA zerstört:

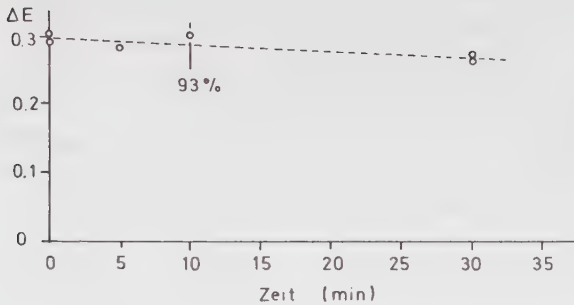


Abb. 19: Abhängigkeit der HMG-CoA-Wiedergewinnung von der Zeitdauer der HClO_4 -Einwirkung (Exptl. Daten s. S. 74).

Um die späteren Meßergebnisse nicht durch diesen - wenn auch geringen - Zersetzungseffekt zu verfälschen, wurde das zur Eichung des Tests verwendete HMG-CoA wie eine Leberprobe behandelt. Dazu wurden steigende Mengen der HMG-CoA-Eichlösung mit Perchlorsäure versetzt und anschließend wieder mit KOH neutralisiert. Aliquote dieser Mischungen dienten zur Bestimmung des spezifischen Tritiumeinbaues in MVL; die Auswertung einer solchen Eichung, die für jeden Test erneut durchgeführt wurde, ist in Abb. 20 wiedergegeben:

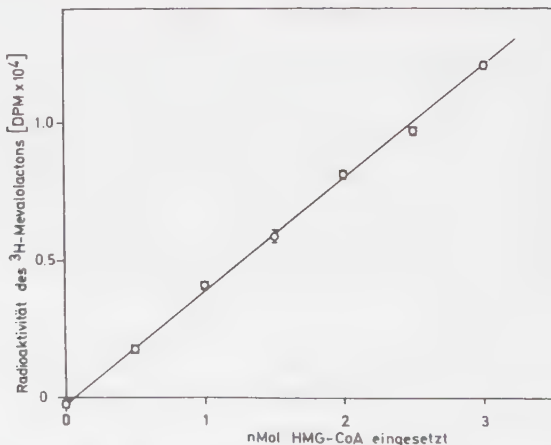


Abb. 20: Eichung des radiochemischen Tests zur Bestimmung der HMG-CoA-Konzentration in Leberextrakten

Die in den eingesetzten Aliquoten der Leberextrakte enthaltenen HMG-CoA-Mengen entsprachen gemäß dem Tritiumgehalt des isolierten MVL etwa 1-2 nMol.

Für Wiederfindungsversuche wurde in jedem Test der HMG-CoA-Gehalt von 3-4 Lebern jeweils ohne und mit Zusatz von synthetischem HMG-CoA zum Leberpulver (vor der Perchlorsäureextraktion) bestimmt. Die Wiederfindungsrate betrug $93 \pm 2\%$. Die nicht ganz vollständige Extraktion des HMG-CoA ist wohl darauf zurückzuführen, daß das Leberpulver nur einmal mit Perchlorsäure extrahiert wurde, um das Aufschlußvolumen so klein wie möglich zu halten.

2.7. Identitätsbeweise für das zelluläre HMG-CoA

Daß mit der beschriebenen Methode ausschließlich HMG-CoA im Lebergewebe erfaßt wird, konnte schon allein dadurch als erwiesen angesehen werden, daß sich die in den Leberextrakten mit HMG-CoA-Reduktase und (4R)-4-³H-NADPH reduzierte Substanz unabhängig von der Art der Reinigung aus der Inkubation wie das aus synthetischem HMG-CoA dargestellte tritiierte Mevalolacton verhielt. Zur zusätzlichen Absicherung dieses Befundes wurden Leberextrakte sowie synthetisches HMG-CoA vor der enzymatischen Reduktion mit und ohne HMG-CoA-Lyase aus Rinderleber vorinkubiert. Bei der anschließenden Aufarbeitung konnte nur in den Proben, denen keine Lyase zugesetzt worden war, tritiiertes Mevalolacton isoliert werden:

Tab. 3a: Zersetzung des HMG-CoA in Eichproben des HMG-CoA-Tests durch Inkubation mit HMG-CoA-Lyase vor Beginn der Reduktase-Reaktion

Probe	HMG-CoA-Zusatz	Lyase-Zusatz	³ H-MVL (dpm)
E.O.1	0 nMol	-	686
.2	0	+	344
1.1	0.91	-	3,192
.2	0.91	+	264
2.1	1.37	-	4,978
.2	1.37	+	214
3.1	1.82	-	6,721
.2	1.82	+	94

Tab. 3b: Zersetzung des HMG-CoA in Leberextrakten durch Inkubation mit HMG-CoA-Lyase vor Beginn der Reduktase-Reaktion

Leber-Probe	Lyase-Zusatz	³ H-MVL (dpm)	HMG-CoA (nMol)
1.1	-	4,700	1.30
.2	+	19	-
2.1	-	5,018	1.38
.2	+	277	-
3.1	-	6,209	1.71
.2	+	157	-
4.1	-	5,154	1.42
.2	+	229	-

Daß unter diesen Bedingungen das HMG-CoA-reduzierende System intakt und nicht etwa von dem in der Inkubation vorhandenen Lyase-Präparat inaktiviert worden war, konnte im optischen Test nachgewiesen werden.

3. Der HMG-CoA-Gehalt der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen (70)

Nachdem sich das radiochemische Testverfahren allen bekannten optischen Testmethoden zur HMG-CoA-Bestimmung in der Empfindlichkeit als weit überlegen erwiesen hatte, konnte die Aufgabe in Angriff genommen werden, den Einfluß von Stoffwechselzuständen mit gesteigerter Ketogenese und veränderter Cholesterolbiosynthese auf den natürlichen HMG-CoA-Gehalt der Rattenleber zu untersuchen.

Für die Tierexperimente wurden dazu die folgenden Lebensbedingungen ausgewählt:

- a) Tag- und Nachtrhythmus
- b) Hunger
- c) Alloxan-Diabetes
- d) Cholesterolfütterung

Über die dabei erzielten Meßergebnisse sei zunächst im einzelnen berichtet; die zusammenfassende Diskussion folgt in Kap. 4.

3.1. Tag- und Nachtrhythmus

Obwohl Einflüsse auf den HMG-CoA-Spiegel wegen der Größenordnung des Substratumsatzes viel eher von Veränderungen der Ketogeneserate her zu erwarten waren, erschien es doch sinnvoll, zuerst zu untersuchen, ob sich auch die tageszeitliche Schwankung der Cholesterolbiosynthese auf die normale HMG-CoA-Konzentration der Leber auswirkt. In diesem Falle hätte bei der Korrelation der weiteren Meßergebnisse der Schlachtzeitpunkt der Versuchstiere berücksichtigt werden müssen.

Der circadiane Rhythmus der Cholesterolproduktion war erstmals in Lynens Arbeitskreis entdeckt worden (71). Die Cholesterolbiosynthese ist bei Ratten nachts stärker als am Tage, was Ausdruck der Dunkelaktivität dieser Tiere ist. Die Aktivität der microsomalen HMG-CoA-Reduktase weist eine gleichartige Periodizität auf (72). Wie Abb. 21 zeigt, bleibt der HMG-CoA-Spiegel der Leber im Tagesverlauf jedoch praktisch konstant und beträgt durchschnittlich etwa 7 nMol/g frischer Leber:

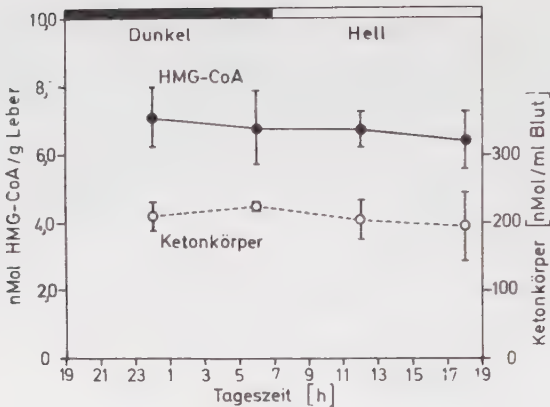


Abb. 21: Abhängigkeit des HMG-CoA-Gehaltes der Rattenleber von der Tageszeit

Die Tageszeit der Schlachtung konnte mithin ohne Einschränkung der Korrelierbarkeit der Meßergebnisse beliebig gewählt werden.

3.2. Hunger

Erhöhte Ketonkörperproduktion ist im wesentlichen die Folge eines eingeschränkten Kohlenhydratstoffwechsels. Im Hungerzustand ist es für den Körper notwendig, Energie aus den leicht zugänglichen Fettreserven zu mobilisieren, um die Glucose für den Bedarf des zentralen Nervensystems bereithalten zu können (46). Durch den verstärkten Abbau der Fette entsteht mehr Acetyl-CoA, als im Citronensäurezyklus der Leberzelle verwertet werden kann. Aus dem restlichen Acetyl-CoA werden dann in der Leber die Ketonkörper gebildet, die als Energieträger von dort über den Kreislauf an die Zielorgane wie Herz, Muskeln und Gehirn, gelangen. Acetoacetat wird zu Acetoacetyl-CoA reaktiviert, in der Thiolase-Reaktion zu Acetyl-CoA gespalten und im Citronensäurezyklus verbrannt (38,73).

Allerdings kann bei ketotischen Zuständen der Abbau der Ketonkörper mit ihrer Produktion nicht mehr Schritt halten und es kommt zu einer Erhöhung des Blutspiegels und zur Ausscheidung im Harn.

Bei der Untersuchung von 24^h gehungerten Ratten stellte es sich heraus, daß der HMG-CoA-Spiegel der Leber im Vergleich zu gefütterten Ratten nur um etwa 30 % angestiegen war, während sich die Konzentration der Ketonkörper im Blut auf den 7-fachen Wert erhöht hatte:

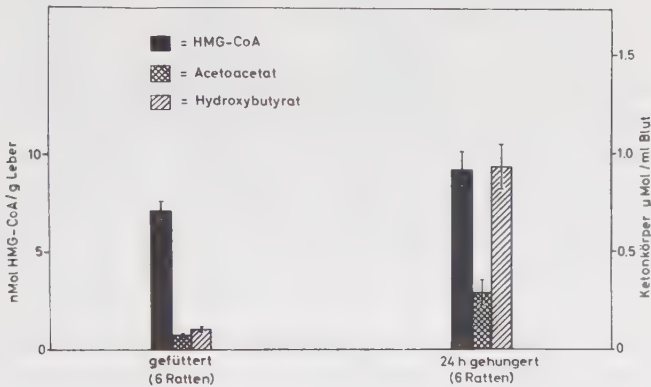


Abb. 22: Vergleich des HMG-CoA-Gehaltes der Lebern gehungerter und gefütterter Ratten

3.3. Alloxandibabetes

Während man gemäß der Definition von Krebs (74) bei der im Hungerzustand auftretenden Ketose von einer "physiologischen" Ketose spricht, kann die gesteigerte Ketonkörperproduktion im akuten diabetischen Zustand eine "pathologische" Ketose verursachen. Im Gegensatz zum Hungerzustand werden hier die Fette in großem Umfang zur Verbrennung mobilisiert, weil die Glucose nur in geringem Umfang abgebaut werden kann. Allerdings schießt der Organismus dabei weit über sein Ziel hinaus; die Konzentration der Ketonkörper im Blut kann Werte bis zu 5 mM erreichen (75).

Durch die dadurch bedingte Erniedrigung des Blut-pH-Wertes kann in Verbindung mit den erhöhten Blutzuckerwerten das diabetische Koma und schließlich der Tod des Organismus eintreten.

Zur experimentellen Erzeugung des diabetischen Zustandes wird im allgemeinen Alloxan verwendet:

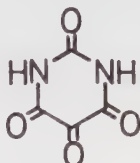


Abb. 23: Alloxan

Es zerstört die β -Zellen des Pankreas; gegenüber anderen β -Zellgiften wie Streptozotocin oder Dehydroascorbinsäure hat es den Vorzug einer problemloseren Anwendung. Bei der Applikation des Alloxans sowie der anschließenden Behandlung der alloxanisierten Versuchstiere müssen einige Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden (siehe auch (46) und experimenteller Teil):

Die Ratten wurden nach der Alloxangabe acht Tage lang mit Depot-Insulin substituiert, um sie in einen schein gesunden Zustand zu überführen. 24^h vor der Schlachtung wurde dann die Insulinsubstitution abgebrochen; anschließend entwickelten die Tiere einen akuten Diabetes, der sich in starker Gewichtsabnahme und größerem Flüssigkeitsverlust äußerte. Trotz der hochgradigen Ketose der diabetischen Ratten stieg der HMG-CoA-Spiegel der Leber nur geringfügig stärker an als im Hungerzustand.

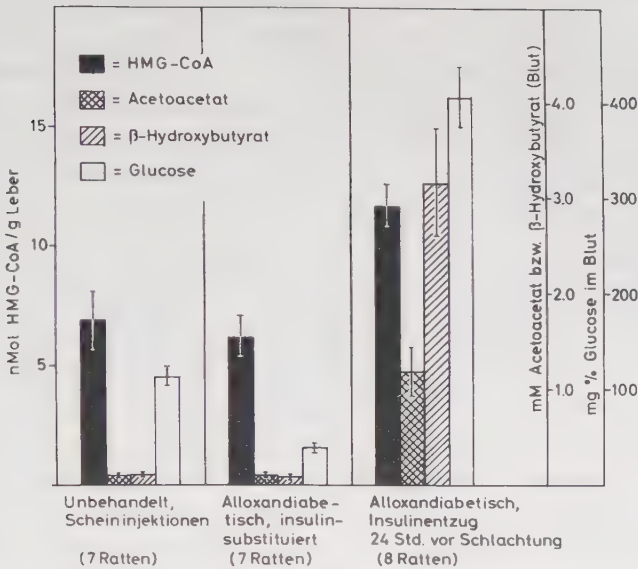


Abb. 24: Vergleich des HMG-CoA-Gehaltes der Lebern alloxan-diabetischer und scheinbehandelter Ratten

3.4. Cholesterolfütterung

Schwankungen der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und der Cholesterolproduktion im Tag- und Nacht-Rhythmus haben, wie im Kap. 3.1. gezeigt wurde, im Gegensatz zu Veränderungen der Ketogeneserate keinen Einfluß auf die HMG-CoA-Konzentration der Leber. Um zu untersuchen, ob der HMG-CoA-Spiegel auch bei anderen, künstlichen Eingriffen in die Mevalonatbiosynthese konstant bleibt, wurden Ratten mit einer cholesterolhaltigen Nahrung gefüttert.

Bei exogen zugeführtem Cholesterol reagiert der Organismus so, als sei eine endogene Überkapazität zur Cholesterolproduktion vorhanden und drosselt die Aktivität der Schrittmacherenzyme, also in erster Linie die HMG-CoA-Reduktase. Hier ist der Drosselungseffekt zu der Tageszeit am deutlichsten, während der die HMG-CoA-Reduktase normalerweise die höchste Aktivität entfaltet,

bei Ratten also in der Dunkelperiode.

Im Versuch wurden die Ratten zwei Tage lang mit Altromin, das 3 % Cholesterol enthielt, gefüttert und um 22^h geschlachtet. Neben HMG-CoA wurden auch wieder die Ketonkörper im Blut bestimmt; als Indikator für das Ansprechen der Cholesterolfütterung wurde die Aktivität der microsomalen HMG CoA-Reduktase der Leber nach dem Test von Huber et al. herangezogen (76).

Entgegen den Erwartungen war ein deutlicher Effekt dieser Behandlung auf die HMG-CoA-Konzentration festzustellen, und zwar sank sie um etwa 28 %; eine gleichzeitige Abnahme der Ketonkörperproduktion war dagegen nicht zu verzeichnen:

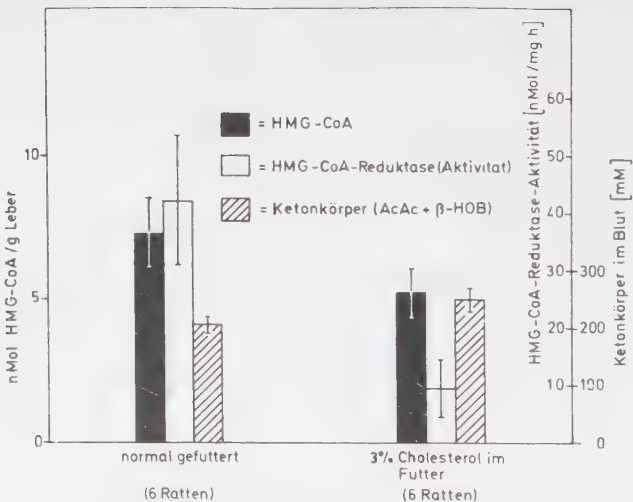


Abb. 25: Vergleich des HMG-CoA-Gehaltes der Lebern cholesterolfütterter und normal ernährter Ratten

4. Zusammenfassende Diskussion

Mit Ausnahme der Untersuchung zum Tag- und Nachtrhythmus war jedes der in Kap. 3 beschriebenen Tierexperimente zweimal durchgeführt worden, um sicherzustellen, daß die Resultate der HMG-CoA-Konzentrationsbestimmung die tatsächlich im HMG-CoA-Stoffwechsel der Rattenleber vorliegenden Verhältnisse widerspiegeln. In allen Fällen stimmten die Befunde des jeweils in dieser Arbeit dargestellten Versuches mit denjenigen des entsprechenden Kontrollexperimentes überein.

In erster Linie läßt sich anhand der in den Tierversuchen gewonnenen Ergebnisse für die Wechselbeziehung zwischen dem HMG-CoA-Gehalt und den unterschiedlichen quantitativen Anforderungen an den HMG-CoA-Umsatz in der Rattenleber feststellen, daß die Stationärkonzentration dieses Metaboliten, die im Normalzustand durchschnittlich 7 nMol/g Frischgewicht beträgt, von regulatorischen Einflüssen, die eine zum Teil erheblich veränderte Kapazitätsausnutzung des HMG-CoA-Stoffwechsels verursachen, weitgehend unberührt bleibt. Vielmehr müssen es somit im wesentlichen die kinetischen Größen des HMG-CoA-Metabolismus, also Synthese- und Verbrauchsgeschwindigkeit des HMG-CoA sein, die je nach Bedarf in weiten Grenzen und gleichsinnig schwanken können.

Dennoch ist deutlich erkennbar, daß ein Ansteigen der Ketonkörperproduktion von einer - wenn auch in der Relation geringfügigen - Erhöhung des HMG-CoA-Spiegels auf 9-12 nMol/g begleitet ist. Weniger als das rein qualitative Phänomen der Ketose scheint dabei entscheidend zu sein, ob es sich um eine physiologische oder eine pathologische Ketose handelt, denn im zweiten Versuch mit gehungerten Ratten konnten HMG-CoA-Konzentrationen ermittelt werden, die nahezu an diejenigen diabetischer Tiere heranreichten.

Würde man den weiteren Betrachtungen nur die Ergebnisse der Versuche 3.1. - 3.3. zugrundelegen, so ließe sich zusätzlich folgern, daß der Hauptanteil des gemessenen HMG-CoA der gesamt-

ten Zelle mitochondriellen Ursprungs ist und zur Ketonkörperbildung herangezogen wird, was auch der Verteilung der HMG-CoA-Synthaseaktivität (2,77) auf die Zellkompartimente entsprechen würde; wäre nämlich die Stationärkonzentration des cytoplasmatischen HMG-CoA der des mitochondriellen HMG-CoA vergleichbar, dann hätte sich in Anbetracht der geringen cytoplasmatischen HMG-CoA-Synthesekapazität auch durchaus die Schwankung der Cholesterolbiosynthese im Tag- und Nachtrhythmus in ähnlichem Umfang wie eine veränderte Ketogeneserate auf den gesamten HMG-CoA-Gehalt der Leberzellen auswirken müssen.

Dieser Deutung widerspricht aber auf den ersten Blick der Befund aus dem Cholesterolfütterungsversuch, nach dem Cholesterol als Rückkopplungshemmer zwar die endogene Cholesterolproduktion und den HMG-CoA-Gehalt, nicht dagegen die Ketogeneserate erniedrigt. Es erscheint jedoch fraglich, ob Minderung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität und erniedrigter HMG-CoA Spiegel in engem Zusammenhang stehen.

Zur Beantwortung dieser Frage müßte näher bekannt sein, inwieweit unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen eine konzentrierte Regulation mehrerer Schlüsselenzyme des HMG-CoA-Metabolismus stattfinden kann, die insbesondere von Decker (42) und Rudney (78) postuliert wird.

Unter dem Gesichtspunkt des HMG-CoA als "branch-point" Metaboliten hatte sich die Aufmerksamkeit der Forschung im wesentlichen auf die HMG-CoA-Reduktase, also auf einen Aspekt der Regulation des HMG-CoA-Verbrauchs, konzentriert; Untersuchungen über die Steuerung der HMG-CoA-Biosynthese wurden dagegen nur in geringem Umfang durchgeführt. Dabei hatten schon Bucher et al. (2) erkannt, daß zumindest bei der Ketogenese die Spaltung des HMG-CoA durch die Lyase-Reaktion nicht der Engpaß der Reaktionssequenz sein kann.

Huth et al. (79) schreiben aufgrund der Untersuchung des Verhältnisses zwischen dem ^{14}C -Gehalt der Carbonylgruppe und dem ^{14}C -Gehalt der Carboxylgruppe der aus (1- ^{14}C)-Fettsäuren gebildeten Acetessigsäure und dessen Beziehung zur Ketogeneserate unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen der Acetoacetyl-

CoA-Thiolase eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Ketonkörperproduktion zu; nach White und Rudney (78) kann aber auch die HMG-CoA-Synthase in gewissem Ausmaß regulatorische Funktionen übernehmen. Die wenigen in der Literatur angegebenen Daten über das Verhalten der HMG-CoA-Synthase unter verschiedenen Stoffwechselzuständen haben McNamara und Rodwell tabellarisch zusammengefaßt (80). Das zunächst etwas uneinheitliche Bild über die Abhängigkeit des HMG-CoA-Gehaltes der Rattenleber von den jeweiligen Lebensbedingungen gemäß Kap. 3.1. - 3.4. hellt sich auf, wenn man es in Beziehung zu diesen Daten setzt; sowohl in der Tendenz als auch der Größenordnung der Veränderung besteht unter entsprechenden Lebensbedingungen zwischen der Synthase-Aktivität und der HMG-CoA-Konzentration der Rattenleber eine deutliche Parallele:

Tab. 4: Verhalten der HMG-CoA-Synthase-Aktivität und der HMG-CoA-Konzentration der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen

Stoffwechsel- bedingung	Zunahme (+) oder Abnahme (-) der			
	HMG-CoA-Synthase-Aktivität * (-fach)			HMG-CoA-Konz. ** (-fach)
	Mitochon- drien	Micro- somen	lösliche Fraktion	ges. Leberzelle
Hunger (2)	+ 2.1	+ 1.7	+ 8.4	+ 0.3
Hunger (77)	+ 1.6		+ 2.9	
Hunger (78)		+ 1.8	+ 1.0	
Cholesterol- diät (78)		- 0.4	- 0.5	- 0.3
Alloxan- diabetes (77)	+ 1.9		+ 2.3	+ 0.7

* entnommen aus (80)

** eigene Messungen

Aus diesem Vergleich muß man zu dem Schluß kommen, daß die Stationärkonzentration des HMG-CoA in der Leber in erster Linie durch die Synthese- und nicht durch die Verbrauchsrate dieses Metaboliten festgelegt ist. Ob diese Feststellung gleichermaßen auf den mitochondriellen und den cytoplasmatischen HMG-CoA-Vorrat zutrifft, kann allerdings erst dann entschieden werden, wenn es gelingt, beide "pools" getrennt zu erfassen. Zur Bewältigung dieses Problems dürfte das von Zuurendonk et al. (81) beschriebene Verfahren zur raschen präparativen Trennung der partikulären Komponenten vom löslichen Cytoplasma der Leberzellen einen gangbaren Weg weisen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Geräte

Kofler-Heizmikroskop, C. Reichert AG, Wien
Zentrifuge 8 x 1350, Stock, Marburg
Automatic Superspeed Centrifuge, Sorvall RC 2 B,
Rotoren GS 3, GSA und SS34
Sorvallbecher, Polycarbonat, Kat. Nr. 270, Polypropylen,
Kat. Nr. 252, mit entsprechenden Adaptoren für Rotor SS 34.
Präparative Ultrazentrifuge, Beckmann, Spinco L, Rotor 40
Tischzentrifuge, Christ Superspeed Junior
pH-Meter, Knick, Berlin, Typ 27, mit Ingold-Einstabmeßkette
405-M 5
Analysenwaage, überschalig, Mettler P 320
Photometer Eppendorf 1101 M, mit Küvettenwechselautomatik
2705 und Schreiber 6511
Eppendorf-Mikroliterpipetten
Hamilton-Mikroliterspritzen 25 µl, Kat. Nr. 702
Einmal-Injektionsspritzen Once 1 ml, steril
Fraktionskollektor LKB Ultro-Rac
UV-Durchflußmonitor LKB Uvicord II mit 2-Kanalschreiber
Schlauchpumpe LKB Varioperpex
Homogenisator Sorvall Omnimix
Ultraschall-Homogenisator Branson, Model S 75 mit Mikro-
spitze
Küchenmaschine Bosch
Whirlmix Cenco
Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, Packard Tri-Carb,
Modelle 2425 und 3385
Dünnschichtscanner, Frieseke-Hoepfner LB 272 mit Dual Rate-
meter-Integrator 2 B 242 K
Frierstoppzange, Eigenbau Moosbauer
Einmal-Plastiksäulen, Chromaflex column, Kontes Glass Co.,
Vineland, New Jersey, USA
Tiefkühltruhe für Betrieb mit fl. N₂, MVE Cryogenics,
New Prague, Minnesota, USA

Modell VPS-3500, mit Einsätzen A-4500 u. Stickstofftank
VL-160L

5.2. Substanzen

3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäure (Schwarz/Mann, Orangeburg,
New York);

D,L-Mevalonsäurelacton (Sigma, St. Louis); Hydrazinhydrat,
D,L-Isocitronensäure-Trinatriumsalz-dihydrat, Na-Glyoxylat
und Mercaptoäthanol (Roth, Karlsruhe); Diketen (Schuchardt,
München); Aluminiumoxid basisch (Woelm, Eschwege); Bio-Rad
AG 1 x 8 Ionenaustauscher, 200-400 mesh, Formiat- oder Chlorid-
Form (Bio-Rad-Laboratories, Richmond, Calif.); Sephadex G 200
superfine (Pharmacia, Uppsala); PPO, Dimethyl-POPOP (Inter-
chem GmbH, München); Unisolve (W. Zinsser, Frankfurt); Di-
thiothreitol (Serva, Heidelberg); Heparin "Liquemin" (Hoff-
mann-LaRoche AG, Grenzach); Depot-Insulin "Hoechst" (Hoechst
AG, Frankfurt-Hoechst); isotonische Kochsalzlösung, steril
(Fresenius, Wiesbaden); Hefe: Bast-Branntweinhefe (Hefe-Mayr,
München); Erbsen: Schalerbsen (Dehner, München).

¹⁴C-HMG-CoA wurde freundlicherweise von Herrn Dr. J. Huber
zur Verfügung gestellt. Alle anderen radioaktiven Substanzen
wurden von Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen.

Enzyme, Coenzyme und die restlichen Substrate stammten von
Boehringer, Mannheim, die übrigen Chemikalien von E. Merck,
Darmstadt, und besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

5.3. Ratten und Standarddiät

Die Ratten waren männliche Sprague-Dawley mit einem Gewicht
von 100-250 g und wurden von der Fa. Wiga, 8741 Sulzfeld, be-
zogen. Sie wurden mit Altromin 1324 gefüttert (Fa. J. Stett-
ner, München).

5.4. Zu Kapitel 2.1 (Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und Gehalt der HMG-CoA-Eichlösung)

5.4.1. Anreicherung der HMG-CoA-Reduktase (50)

Pro Anreicherungsang wurden anfänglich 2.0 kg, später 1.5 kg Branntweinhefe eingesetzt, die in einem offenen Dewar-Gefäß mit 6 l Inhalt aufgeschlossen wurden, wozu etwa 8-10 l flüssigen Stickstoffs notwendig waren.

Tab. 5: Anreicherung der HMG-CoA-Reduktase aus Hefe nach Kirtlex und Rudney

Ausgangsmenge 2.0 kg Branntweinhefe; Literaturangaben in Klammern

Schritt	Volumen (ml)	Ges.- Protein* (mg)	Ges. Akt.** (U)	Spez. Akt. (mU/mg)	Ausbeute (%)
Aceton- fällung	415	8730	24.2	2.78 (6.0)	100 (100)
Säure- fällung	85	956	21.3	22.25 (26.0)	88 (61)
Ammonium- sulfat- fällung	41	415	16.5	51.2 (128.5)	66.4 (57)
Hitze- schritt	35	113	12.9	114.0 (140.5)	53.2 (52)
Zinkeluat (1. 0.3 M Phos.-Fr.)	9.7	26	6.66	256.0 (416.5)	27.5 (29)

* Die Proteinbestimmung wurde nach dem Biuret-Verfahren durchgeführt.

** 1 mU = 2 nMol NADPH/min

Das Enzym wurde bei 4° C aufbewahrt und durfte für Testzwecke nicht älter als eine Woche sein.

5.4.2. Darstellung von HMG-CoA (3)

Eingesetzt wurden 451.0 mg 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure (HMG). Das zunächst rohe HMG-Anhydrid wurde unter Erhitzen im Ölbad auf 90° in 15.0 ml wasserfreiem Benzol gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Zimmertemperatur schieden sich lange, farblose Nadeln ab; das Benzol wurde dekantiert, der Rückstand wiederum in 14.0 ml Benzol aufgenommen, im Ölbad bei 95° C gelöst und heiß abfiltriert. Nach Erkalten wurde das Benzol dekantiert und die HMG-Anhydrid-Kristalle im Vakuum-exsikkator vom restlichen Benzol befreit. Die Ausbeute an HMG-Anhydrid betrug 226.3 mg (= 82.3 % der Lit.); Schmelzpunkt $102-103.5^{\circ}$ (Lit.: $102-103^{\circ}$). Aufbewahrt wurde die Substanz im Exsikkator über Blaugel.

Zur Darstellung von HMG-CoA wurden jeweils 23.3 mg Coenzym A mit 7 mg HMG-CoA versetzt. Auf die H_2S -Einleitung wurde wegen des inzwischen erhältlichen reinen Coenzym A verzichtet. Der Verlauf der Reaktion konnte mit dem Nitroprussidnatriumtest verfolgt werden:

Auf einer Tüpfelplatte werden je ein Tropfen der Probe, einer gesättigten $KHCO_3$ -Lösung und einer 0.067 M Natriumprussidlösung (20 mg/ml) miteinander vermischt. Bei Vorliegen von freien SH-Gruppen entsteht eine violette Färbung.

Nach beendeter Umsetzung wurde die HMG-CoA-Lösung in 0.4 ml-Portionen aufgeteilt und bei -18° C aufbewahrt. Die Ausbeute wurde enzymatisch je nach Ansatz zu 35.9 - 37.7 % (= 105-110 % der Literaturangabe) nach CoA-Einwaage bestimmt.

5.4.3. Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und des Gehaltes der nach Kap. 5.4.2. hergestellten HMG-CoA Eichlösung

In eine 1-cm Glasküvette mit 1.5 ml Fassungsvermögen wurden nacheinander pipettiert: 0.10 ml 1.0 M K-Phosphatpuffer, pH 6.5, 0.02 ml 0.1 M Na-EDTA, pH 7.0, 0.02 ml 0.1 M Cysteamin, pH 7.0, 0.03 ml 0.01 M NADPH (1 mg NADPH/0.10 ml 50 mM $KHCO_3$), 0.81 - x ml H_2O und 0.02 ml HMG-CoA-Reduktase. Nun wurde bei

$\lambda = 334 \text{ nm}$ und $T = 25^{\circ} \text{ C}$ etwa 4-6 min lang der Blindlauf der Reaktion verfolgt. Anschließend wurde die Reduktasereaktion durch Zugabe von $x \text{ ml}$ ($= 2.5 - 20.0 \text{ } \mu\text{l}$) der HMG-CoA-Lösung gestartet. Je nach Aktivität des Enzyms und der zugegebenen HMG-CoA-Menge war die Umsetzung nach 5-15 min beendet. Der durch Zugabe der HMG-CoA-Lösung verursachte Extinktionssprung war praktisch vernachlässigbar klein. Die Cysteaminlösung durfte nicht älter als einen Tag sein (23 mg Cysteamin·HCl wurden in 1 ml H_2O gelöst, mit 1 Tropfen 1 N KOH neutralisiert und auf 2.00 ml H_2O aufgefüllt). Das Ergebnis einer HMG-CoA-Bestimmung ist in Abb. 2, S. 10, wiedergegeben.

Der Berechnung der Reduktase-Aktivität wurde stets die Anfangssteigung der mit 20 μl HMG-CoA-Zusatz erhaltenen Umsatzkurve zugrundegelegt, da unter diesen Bedingungen sowohl in bezug auf die HMG-CoA- als auch die NADPH-Konzentration praktisch im Substrat-Sättigungsbereich des Enzyms gearbeitet wurde.

Die Zusammensetzung der Inkubationsmischung für die enzymatische HMG-CoA-Bestimmung mit der HMG-CoA-Lyase sowie die Berechnung des HMG-CoA-Gehaltes nach diesem Test entsprachen dem von Hamprecht und Lynen angegebenen Verfahren (82). Die HMG-CoA-Lyase war nach der Vorschrift von Lynen et al. (1) unter Verzicht auf die Dialyse der Ammoniumsulfatfällung angereichert worden.

5.5. Zu Kap. 2.2 (Reinheit der HMG-CoA-Reduktase)

Die Zusammensetzung der Testmischung zur Untersuchung der Reduktase-Präparation auf HMG-CoA-zersetzende Aktivitäten (Abb. 4, S. 13) entsprach derjenigen für die enzymatische HMG-CoA-Bestimmung mit der Reduktase (Kap. 5.4.3.), nur wurden jeweils 10 μl HMG-CoA vorgelegt und die Reduktionsreaktion nach entsprechender Vorinkubationsdauer (1, 3, 5 und 10 min, 25° C) durch die Zugabe des NADPH gestartet. Der durch den NADPH-Zusatz anfänglich verursachte Extinktionssprung wurde in einer Referenzprobe ermittelt, der statt HMG-CoA nur Wasser hinzupipettiert worden war.

Das zur Untersuchung der HMG-CoA-Reduktase-Präparation auf HMG-CoA-Synthase-Aktivität notwendige Acetoacetyl-CoA wurde nach der unter (49) angegebenen Vorschrift hergestellt. Dazu wurden 5.0 mg Coenzym A in 5.0 ml H_2O gelöst, mit 1 N NaOH auf pH 8-8.5 eingestellt, mit 0.01 ml frisch destilliertem Diketen ($K_p = 66^\circ$ bei ca. 90 Torr, Stickstoffatmosphäre) versetzt und der pH-Wert der Reaktionsmischung mit 1 N NaOH bei pH 7-7.5 gehalten. Die Umsetzung war nach etwa 4 min (Eiskühlung) beendet, was mit dem Nitroprussidnatriumtest (Kap. 5.4.2.) verfolgt werden konnte.

Zur Acetoacetyl-CoA-Bestimmung wurden in eine 1-cm Glasküvette pipettiert: 0.20 ml 0.5 M K-Phosphatpuffer, pH 7.5, 0.02 ml 0.01 M NADH (1.0 mg NADH/0.10 ml 50 mM $KHCO_3$), 0.77 - x ml H_2O , x ml (20 -100 μ l) der Acetoacetyl-CoA-Lösung. Die Reaktion wurde nach Bestimmung der Grundextinktion bei $\lambda = 334$ nm und 25° C durch Zugabe von 0.01 ml β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (Enzymsuspension mit Puffer 1 : 20 verdünnt) gestartet. Die Konzentrationsbestimmung ergab einen Wert von 103 nMol Acetoacetyl-CoA/0.10 ml.

Acetyl-CoA wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Seyffert zur Verfügung gestellt.

Für den in Abb. 5, S. 14 dargestellten Test auf HMG-CoA-Synthase-Aktivität der HMG-CoA-Reduktase-Präparation wurden nacheinander in eine 1-cm-Glasküvette pipettiert: 0.64 ml 0.1 M K-Phosphatpuffer, pH 6.5, 0.02 ml 0.1 M Na-EDTA, pH 7.0, 0.02 ml 0.1 M Cysteamin, pH 7.0, 0.02 ml 0.01 M NADPH, 0.20 ml 1 mM Acetoacetyl-CoA und 0.05 ml 6 mM Acetyl-CoA. Nun wurde bei $\lambda = 334$ nm und $T = 25^\circ$ C drei min lang der Blindlauf der Reaktion verfolgt. Anschließend wurden 0.05 ml der HMG-CoA-Reduktase hinzupipettiert und wiederum der NADPH-Verbrauch in der Testmischung gemessen. Durch spätere Zugabe von 0.01 ml einer 3.7 mM HMG-CoA-Lösung konnte die Funktionsfähigkeit des Reduktase-Systems unter den vorliegenden Testbedingungen nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung des HMG-CoA-Reduktase-Präparates auf Mevalonat-Kinase-Aktivität (Abb. 6, S. 15) wurden nacheinander in eine 1-cm Glasküvette pipettiert: 0.10 ml 1.0 M K-Phosphatpuffer,

pH 6.5, 0.10 ml 2 mM ATP, 0.10 ml 2 mM Phosphoenolpyruvat, 0.03 ml 0.01 M NADH (in 50 mM KHCO_3), 0.01 ml Pyruvat-Kinase und 0.01 ml Lactat-Dehydrogenase. Nun wurde bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ \text{ C}$ der Blindlauf der Reaktion verfolgt. Nach 4 min wurden 0.05 ml 20 mM K-Mevalonat, pH 7.0 (dargestellt aus Mevalolacton nach (23)) zugefügt und die Extinktionsveränderung bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ beobachtet. Nach 4 min wurden zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des gekoppelten Tests 0.02 ml einer 50 mM ADP-Lösung zugesetzt.

5.6. Zu Kap. 2.3 (Darstellung von (4R)-4- ^3H -NADPH)

5.6.1. Enzymatische Synthese von NADP^+ aus NAD^+

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der enzymatischen Synthese von NADP^+ aus NAD^+ wurden jeweils in zwei Zentrifugengläser pipettiert: 0.40 ml 20 mM NAD^+ (5.77 mg = 8.0 μMol $\beta\text{-NAD}^+$, freie Säure/0.40 ml), 0.20 ml 80 mM ATP (für die Probe mit zweifachem ATP-Überschuß; 9.90 mg ATP, di-Natriumsalz /0.20 ml) bzw. 0.20 ml 120 mM ATP (für die Probe mit dreifachem ATP-Überschuß; 14.9 mg ATP, di-Natriumsalz/0.20 ml), 2.00 ml 0.5 M K-Phosphatpuffer pH 7.5, 0.20 ml 0.1 M MgCl_2 , 0.04 ml NAD^+ -Kinase (4 mg = 60 mU/0.04 ml Puffer), 0.08 ml 0.1 N NaOH und 0.20 ml 80 mM Nicotinsäureamid.

Die beiden Mischungen wurden bei 37° C im Wasserbad inkubiert. In bestimmten Zeitabständen (s. Abb. 7, S. 18) wurden jeweils 100 μl entnommen, zum Abstoppen der Kinase-Aktivität 3 min auf 85° C erhitzt, im Eisbad gekühlt und abzentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 50 μl auf den NADP^+ -Gehalt getestet:

Dazu wurden in einer 1-cm Glasküvette miteinander gemischt: 0.80 ml 0.1 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,6, 0.10 ml 0.1 M MgCl_2 , 0.05 ml 30 mM Glucose-6-phosphat (10 mg G-6-P, di-Natriumsalz/1.00 ml H_2O), 0.05 ml der NADP^+ -Inkubation. Nun wurde bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ \text{ C}$ die Grundextinktion der Mischung bestimmt und anschließend die NADPH-Bildung durch Zugabe von 5 μl G-6-P-Dehydrogenase gestartet.

5.6.2. Enzymatische Synthese von NADPH aus NADP⁺

Für die in Abb. 8, S. 19 wiedergegebene Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der NADPH-Bildung aus NADP⁺ durch die G-6-P-Dehydrogenase-Reaktion wurde eine NADP⁺-Synthese gemäß Kap. 5.6.1. durchgeführt (V = 3.12 ml, 22^h Inkubation bei 37° C). Dieser Mischung wurden anschließend hinzupipettiert: 0.20 ml 125 mM G-6-P (21.4 mg = 25.2 µMol G-6-P, di-Natriumsalz/0.50 ml H₂O), 0.64 ml H₂O und 0.04 ml G-6-P-Dehydrogenase (= 14 U). Die Mischung wurde im Wasserbad bei T = 25° C gehalten. In Abständen von 10 min wurden jeweils 100 µl entnommen, die enzymatischen Vorgänge durch 3 min Erhitzen auf 85° C abgestoppt, die Lösung sofort im Eisbad gekühlt, abzentrifugiert und 50 µl des Überstandes auf den NADPH-Gehalt getestet.

Für diesen Test wurden in einer 1-cm-Glasküvette miteinander gemischt: 0.20 ml 0.5 M K-Phosphatpuffer, pH 7.5, 0.68 ml H₂O, 0.02 ml 15 mM α-Ketoglutarat (5 mg α-Ketoglutar säure/2 ml Puffer), 0.02 ml 3.2 M Ammoniumacetat, 0.02 ml 0.1 M Na-EDTA, pH 7.0 und 0.5 ml der denaturierten NADPH-Probe. Die Grundextinktion der Mischung wurde bei λ = 334 nm und T = 25° C bestimmt und die Reaktion durch Zusatz von 5 µl Glutamat-Dehydrogenase in Gang gesetzt.

5.6.3. Abhängigkeit der NADPH-Zersetzung von der Erhitzungsdauer bei verschiedenen pH-Werten

Es wurden fünf NADPH-Lösungen in K-Phosphatpuffer verschiedener pH-Werte mit folgender Zusammensetzung hergestellt: Je 4.2 mg NADPH, tetra-Natriumsalz (= 4.28 µMol) wurden in Zentrifugengläsern mit 1.00 ml 0.5 M K-Phosphatpuffer, pH 7.0, 7.25, 7.5, 7.75 und 8.0 (Lösungen 1-5), je 0.10 ml 0.1 M MgCl₂, 0.04 ml 0.1 N NaOH, 0.10 ml 80 mM Nicotinamid und 0.76 ml H₂O versetzt. Die einzelnen Proben wurden im Wasserbad auf 85° C erhitzt und jeder Probe in Abständen von 30 sec. jeweils 50 µl entnommen, in einer 1-cm Glasküvette mit 0.95 ml 50 mM KHCO₃ versetzt und die Extinktion bei λ = 334 nm und T = 25° C bestimmt (gemessen gegen KHCO₃-Lösung). Der ursprüng-

liche NADPH-Gehalt der Proben wurde ebenfalls optisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9, S. 20 wiedergegeben.

5.6.4. Darstellung von (4R)-4-³H-NADPH aus 4-³H-NAD⁺ zur radiochemischen HMG-CoA-Bestimmung

Zur Herstellung der 4-³H-NAD⁺-Vorratslösungen wurden 80.0 mg nichtradioaktives β -NAD⁺ (freie Säure, = 111 μ Mol) in 5.58 ml H₂O bidest. gelöst und davon 5.00 ml in die das radioaktive NAD⁺ (250 μ Ci, 5 μ Mol) enthaltende Ampulle pipettiert. Nach guter Durchmischung wurde die Lösung in 0.40 ml- und 0.20 ml-Fractionen auf Zentrifugengläser mit spitz zulaufendem Boden aufgeteilt und bei -18° C aufbewahrt. Eine 0.20 ml-Probe enthielt somit 4.16 μ Mol NAD⁺ mit einer Radioaktivität von 10 μ Ci und reichte für einen radiochemischen HMG-CoA-Test mit maximal 40 Einzelproben aus.

Für die Darstellung von (4R)-4-³H-NADPH wurden je nach Testumfang entweder 0.20 oder 0.40 ml der NAD⁺-Vorratslösung eingesetzt.

Zur Synthese von tritiiertem NADPH für eine Testreihe mit maximal 40 Proben wurden zu 0.20 ml der NAD⁺-Vorratslösung hinzupipettiert: 0.10 ml 0.126 M ATP (15.2 mg ATP, di-Natriumsalz /0.20 ml), 0.10 ml 0.1 M MgCl₂, 1.00 ml 0.5 M K-Phosphatpuffer pH 7.5, 0.10 ml 80 mM Nicotinamid, 0.04 ml 0.1 N NaOH und 0.02 ml NAD-Kinase (2 mg Lyophilisat/0.02 ml Puffer = 30 mU). Das Zentrifugenglas wurde mit Parafilm verschlossen und die Mischung 22^h im Wasserbad bei 37° C gehalten. Danach wurden 0.07 ml H₂O, 0.25 ml 0.1 N NaOH, 0.10 ml 0.126 M G-6-P (8.6 mg G-6-P, di-Natriumsalz/0.20 ml = 25.2 μ Mol) und 0.02 ml G-6-P-Dehydrogenase (14 U) hinzugefügt und die Mischung 60 min bei 25° C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch 3 min Erhitzen auf 85° C zerstört, die NADPH-Inkubation im Eisbad rasch abgekühlt, das denaturierte Protein abzentrifugiert und der Überstand bei 0° C gehalten. Er stellte die gebrauchsfertige Lösung des radioaktiven NADPH dar; 50 μ l enthielten je nach Ansatz durchschnittlich 70 nMol (4R)-4-³H-NADPH (im optischen Test mit der HMG-CoA-Reduktase gemessen).

5.7. Zu Kap. 2.4 (Bildung von tritiiertem Mevalonat bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4-³H-NADPH)

5.7.1. Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4-³H-NADPH

Die Zusammensetzung der Inkubationsmischung für die enzymatische Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4-³H-NADPH entsprach grundsätzlich der des optischen HMG-CoA-Tests (Kap. 5.4.3.), nur daß jeweils 0.05 ml der nach Kap. 5.6.4. hergestellten NADPH-Lösung, 0.05 ml HMG-CoA-Reduktase (ca. 30 mU), entsprechend weniger H₂O sowie z.T. verdünntere HMG-CoA-Lösungen wegen der höheren Empfindlichkeit des Tests eingesetzt wurden. Die Inkubationsmischungen wurden in Zentrifugengläsern mit rundem Boden angesetzt und 60 min im Wasserbad bei 25° C gehalten.

Anschließend wurden die Proben 3 min auf 85° C erhitzt und danach in Eiswasser wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch kurze Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde das an den Wänden der Zentrifugengläser kondensierte Wasser wieder in die Inkubationsmischung befördert. Je nachdem, ob nur qualitative oder quantitative Bestimmungen des Tritiumeinbaues beabsichtigt waren, wurden die Proben direkt weiterverarbeitet oder zunächst mit ¹⁴C-Mevalonat zur Extraktionsstandardisierung versetzt.

5.7.2. ¹⁴C-Mevalonat-Lösung zur Extraktionsstandardisierung

0.45 ml 2-¹⁴C-Mevalonsäure-DBED-Salz in H₂O (10 µCi/ml) wurden mit 7.45 ml einer 0.08 M Mevalolacton-Lösung (90.5 mg/8.57 ml H₂O) versetzt. 20.0 µl dieser Lösung, die 27.000 dpm an ¹⁴C-Mevalonat enthielten, wurden als Extraktionsstandard jeder Inkubation zur quantitativen Bestimmung des Tritiumeinbaues in das enzymatisch aus HMG-CoA gebildete Mevalonat zugefügt (Hamilton-Spritze mit fest einstellbarem Hub).

5.7.3. Isolierung und Reinigung des radioaktiven Mevalonats aus der Inkubation und Bestimmung seiner Radioaktivität

Die nach Kap. 5.7.1 hergestellten Inkubationen wurden bei Raumtemperatur im Vakuumexsikkator (Wasserstrahlvakuum) über P_2O_5 unter häufiger Erneuerung des Trockenmittels innerhalb von 1-2 Tagen bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde jede Probe mit 0.20 ml 3N H_2SO_4 versetzt und nach dem Verreiben mit einem Glasstab 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um das Mevalonat in das Mevalolacton zu überführen. Der Glasstab wurde dabei in der jeweiligen Probe belassen. Um das Wasser und die überschüssige Säure wieder zu binden, wurden die Proben mit je 3.0 g wasserfreiem Na_2SO_4 gründlich vermisch, samt Glasstab mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. (In dieser Form konnten die Mischungen bei 4° C für längere Zeit, mindestens für eine Woche, ohne meßbare Zersetzung aufbewahrt werden).

Das Mevalolacton wurde 1 x mit 4 ml, dann 3 x mit je 2 ml peroxid- und wasserfreiem Äther extrahiert, wobei das mit dem Glasstab aufgerührte Na_2SO_4 nach jeder Elution in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert wurde. Die Überstände der fraktionierten Extraktion einer Probe wurden in ein Zentrifugenglas mit spitz zulaufendem Boden dekantiert und der Äther durch Eintauchen der offenen Gläser in ein Wasserbad von 38-39° C abgedampft (23).

Dünnschichtchromatographie

Der Rückstand der Ätherextraktion einer Probe wurde in 100 µl Aceton aufgenommen und portionsweise mit einer 50 µl-Eppendorfpipette unter leichtem Stickstoffstrom punktförmig (Ø maximal 5 mm) auf die Kieselgelschicht (Merck DC-Alufolie 20 x 20 cm, Kieselgel F 254, schnellaufend, Schichtdicke 0.25 mm) aufgetragen. Das Zentrifugenglas wurde nochmals mit 50 µl Aceton nachgespült, das ebenfalls auf den gleichen Punkt aufgetragen wurde. Der Abstand der Auftragungspunkte zweier Proben betrug 2.4 cm; auf diese Weise konnten auf einer Folie bis zu 8 Proben gleichzeitig chromatographiert werden. Entwickelt wurden die Chromatogramme mit einem Ge-

misch von Benzol und Aceton im Volumenverhältnis von 1:1 als Laufmittel. Die Laufstrecke betrug 17.0 cm, die Laufzeit etwa eine 3/4 Stunde. Die Lokalisation des radioaktiven Mevalolactons wurde an den beiden äußeren und einer mittleren Auftragung mit dem Dünnschichtscanner bestimmt. Entsprechend dem Radiogramm wurden auf die Kieselgelplatte mit Bleistift Rechtecke derart eingezeichnet, daß der das radioaktive MVL einer jeden Probe enthaltende Schichtbereich in die Mitte einer Fläche von 2.4 x 3.2 cm zu liegen kam. Die einzelnen Flächen wurden gekennzeichnet und vorsichtig ausgeschnitten. Die Kieselgelschicht eines Plättchens wurde durch Knicken der Alufolie abgelöst und mit einem kleinen Spatel durch einen Pulvertrichter in ein Zentrifugenglas mit rundem Boden gefüllt. Die an der Folie noch haftenden Schichtreste wurden mit dem gleichzeitig zur Extraktion verwendeten Äther nachgespült. Extrahiert wurde 1 x mit 5 ml und 1 x mit 2 ml Äther unter Verreiben der Kieselgelschicht mit einem Glasstab. Nach kurzer Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurden die Überstände einer Ätherextraktion vorsichtig in ein Plastik-Szintillationsfläschchen dekantiert und vereinigt. Die Szintillationsfläschchen wurden mit einer Reagensglasklammer als Halterung in ein Wasserbad von 39° C zum Verdampfen des Äthers getaucht. Zum Schluß wurden 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugesetzt und die Radioaktivität der Probe bestimmt.

Säulenchromatographie

Als Säulen wurden kurze Pasteurpipetten verwendet (Länge 150 mm, innerer Durchmesser 5.5 mm). Als unterer Säulenabschluß diente eine Glaskugel von 2 mm Durchmesser. Zur Aufnahme des Elutionsmittels wurde auf das obere Ende der Pasteurpipette ein Plastiktrichter aufgeschoben, der von den Kontes-Chromaflex-Säulen stammte und dessen untere Öffnung passend zurechtgeschnitten worden war (77). Zur Füllung der Säule wurden das untere Ende durch Dagegendrücken eines Gummistopfens mit einer Hebebühne verschlossen und die Säule mit etwa 3 ml Essigsäureäthylester aufgefüllt. Anschließend wurde langsam Kieselgel 60, Korngröße 0.063 - 0.125 mm, 120 - 130 mesh. (Merck), bis zu einer Füllhöhe von 2.0 cm hineingeschich-

tet und der überschüssige Essigester durch vorsichtiges Entfernen des Gummistopfens ablaufen gelassen. Dann wurde ein Szintillationsfläschchen unter die Säule gestellt und der Rückstand der Ätherextraktion einer HMG-CoA-Inkubation mit 3 x je 100 µl Essigsäureäthylester aus dem Zentrifugenglas herausgespült, auf die Säule aufgetragen, mit 3.7 ml Essigester in das Szintillationsfläschchen eluiert und durch Zusatz von 10 ml Szintillationslösung zur Radioaktivitätsbestimmung vorbereitet.

Radioaktivitätsbestimmung

Die Szintillationsflüssigkeit bestand aus einer Lösung von 4 g PPO und 0.2 g Dimethyl-POPOP/l Toluol. Mit Proben, die 10 ml dieser Lösung, eine bekannte Menge ^{14}C -Hexadecan bzw. ^3H -Hexadecan und ansteigende Mengen Essigsäureäthylester (0-4.5 ml) enthielten, wurden die Quenchkorrekturkurven für das Flüssigkeitsszintillationsspektrometer in Doppelmarkierungseinstellung zur Berechnung der dpm-Werte bestimmt.

5.8. Zu Kap. 2.5 (Untersuchungen zum Mechanismus der Tritiumübertragungsreaktion bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4- ^3H -NADPH)

5.8.1. Enzymatische Reduktion von Glyoxylat mit (4R)- und (4S)-4- ^3H -NADPH

Wie schon erwähnt, konnte die Anreicherung der Glyoxylat-Reduktase aus Erbsen nach Krakow et al. (64) nicht vollständig reproduziert werden, was insbesondere die schrittweise Extraktion des Niederschlags der Ammoniumsulfatfällung mit Na, K-Phosphatpuffer betraf. Der Überstand der jeweiligen Extraktion bestand aus einer grünlich-gelben, schleimartigen Masse, die auch durch Dialyse nicht stärker verflüssigt werden konnte. Der gesamte Niederschlag war schon nach der dritten Extraktion vollständig gelöst. Alle Fraktionen enthielten große Mengen an Glyoxylat-reduzierender Enzymaktivität. Da die zweite Phosphatpuffer-Elution die dünnflüssigste Konsistenz aufwies, wurde sie als Quelle für die NADPH-abhängige Glyoxylat-Reduktase benutzt.

5,65 mg Na-Glyoxylat wurden in 10.0 ml H_2O gelöst und der genaue Gehalt der Lösung enzymatisch mit dem Erbsenenzym bestimmt. Dazu wurden nacheinander in eine 1-cm Glasküvette pipettiert: 0.10 ml 1 M K-Phosphatpuffer pH 6.5, 0.83 - x ml H_2O , 0.02 ml 0.01 M NADPH in 0.05 M $KHCO_3$, 0.05 ml Enzym (ca. 30 mU). Dann wurde bei $\lambda = 334$ nm und $T = 25^\circ C$ 4 min lang der Blindlauf der Reaktion verfolgt und anschließend die Reduktase-Reaktion durch Zugabe von x ml (2.5 - 20.0 μl) der Glyoxylat-Lösung gestartet.

Mit den gemessenen Extinktionswerten wurde der Glyoxylatgehalt zu 45.8 nMol/10 μl (= 93.3 % nach Einwaage) berechnet.

Zur gleichzeitigen Darstellung von (4R)- und (4S)-4- 3H -NADPH wurde zunächst entsprechend Kap. 5.6.4. aus einer 0.20 ml 4- 3H -NAD $^+$ -Vorratslösung 4- 3H -NADP $^+$ synthetisiert ($V = 1.56$ ml). Diese 4- 3H -NADP $^+$ -Lösung wurde in zwei gleiche Hälften aufgeteilt.

Für die Synthese von (4R)-4- 3H -NADPH wurden zu der einen Hälfte (0.78 ml) hinzupipettiert: 0.10 ml 63 mM G-6-P (4.4 mg G-6-P, di-Natriumsalz/0.20 ml H_2O), 0.01 ml G-6-P-Dehydrogenase (7 U) sowie 0.11 ml 0.1 N NaOH. Inkubiert wurde 60 min bei $25^\circ C$; nach 3 min Erhitzen auf 85° , sofortiger Abkühlung in Eiswasser und kurzer Zentrifugation war die Lösung für den Einsatz im Glyoxylat-Test gebrauchsfertig.

Für die Synthese von (4S)-4- 3H -NADPH aus der anderen Hälfte der NADP $^+$ -Inkubation wurde in gleicher Weise verfahren, nur daß die Reduktion des Coenzyms durch Zugabe von 0.10 ml 126 mM D,L-Isocitrat (7.4 mg Isocitronensäure, tri-Natriumsalzdihydrat/0.20 ml H_2O) und 0.01 ml Isocitrat-Dehydrogenase (200 mU) erfolgte.

Zur Untersuchung der Stereospezifität der Glyoxylat-Reduktion in bezug auf die Übertragung des Coenzym-Wasserstoffs wurden insgesamt vier Inkubationen hergestellt; davon zwei mit A- 3H -NADPH, einmal mit und einmal ohne Glyoxylatzusatz, sowie entsprechend zwei mit B- 3H -NADPH:

In Zentrifugengläser mit spitz zulaufendem Boden wurden pipettiert: 0.10 ml 1.0 M K-Phosphatpuffer pH 6.5, 0.80 - x ml H_2O , 0.05 ml A- bzw. B- 3H -NADPH, 0.05 ml Glyoxylat-Reduktase aus Erbsen sowie x ml (0 bzw. 20 μl = 91.6 nMol) Glyoxylat. Die Proben wurden 60 min bei 25° C gehalten, anschließend 3 min auf 85° C erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und in einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Jeder Probe wurden zur Isolationsausbeute-Bestimmung sowie zur Zuordnung der Radioaktivitätsbanden der folgenden Säulenchromatographie zur Glykolsäure 20.0 μl (40,850 dpm) einer Na-1- ^{14}C -Glycolat-Lösung zugesetzt.

Zur Säulenchromatographie wurden die Proben auf eine Anionenaustauscher-Säule (Dowex 1 x 8, 200-400 mesh, Acetatform, Dimension 7 x 35 mm (Kontes disposable column)) aufgetragen. Die Säule wurde danach mit 20 ml H_2O gewaschen und mit 1 N Essigsäure eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen in Szintillationsfläschchen aufgefangen, mit je 10 ml Unisolve gemischt und im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer auf den absoluten Tritium- und ^{14}C -Gehalt anhand entsprechender Quenchkorrekturkurven untersucht (Abb. 14, S. 30). Nach den wiedergefundenen ^{14}C -Impulsen war die Elution der Glykolsäure praktisch 100 %ig.

Bei der Ionenaustauschchromatographie der radioaktiven Glykolsäure fiel auf, daß die tritiierte Glykolsäure etwas eher als die ^{14}C -markierte Glykolsäure im Eluat erschien; sicher ist dieser Umstand auf den gegenüber dem radioaktiven Kohlenstoff wesentlich größeren Isotopeneffekt des Tritiums zurückzuführen, der gerade in einem relativ kleinen Molekül wie der Glykolsäure einen deutlichen Einfluß auf dessen chromatographisches Verhalten ausübt.

5.8.2. Vergleich des Ausmaßes der Tritiumübertragung bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA und Oxalacetat mit (4R)-4- 3H -NADPH

Die Maisblätter für die Anreicherung der NADP⁺-spezifischen Malatdehydrogenase nach Johnson und Hatch (65) waren im Spätsommer von einem dem Institut nahegelegenen Maisfeld geholt

worden. Das gereinigte Enzym wurde, wie in der Literatur beschrieben, in einer 70 %igen Ammoniumsulfatlösung bei 4° C aufbewahrt und blieb in dieser Form für mindestens ein Jahr stabil. Zur Reaktivierung der Enzymaktivität wurde ein Teil der Suspension (1.0 ml) nach Zentrifugation und Abhebern des Überstandes in 1.2 ml Tris-Puffer mit DTT eine Stunde lang bei 30° C inkubiert.

10.2 mg Oxalessigsäure wurden in 10 ml 0.1 M K-Phosphatpuffer, pH 7.0, gelöst. Zur enzymatischen Gehaltsbestimmung wurden nacheinander in eine 1-cm Glasküvette pipettiert: 0.10 ml 1.0 M K-Phosphatpuffer, pH 7.0, 0.02 ml 0.1 M Na-EDTA, pH 7.0, 0.02 ml 0.1 M Cysteamin, pH 7.0, 0.02 ml 0.1 M MgCl_2 , 0.03 ml 0.01 M NADPH in 0.05 M KHCO_3 , 0.81 - x ml H_2O sowie 0.02 ml Malatdehydrogenase aus Maisblättern (20 mU). Nun wurde bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ \text{ C}$ die Extinktion bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von x ml (2.5 - 15.0 μl) der Oxalacetatlösung gestartet.

Für die Reduktion mit tritiiertem NADPH wurde diese Oxalacetatlösung mit H_2O auf eine Konzentration von genau 1.0 mM (10 μl = 10 nMol), die nach Kap. 5.4.2. hergestellte HMG-CoA-Lösung auf eine Konzentration von genau 0.5 mM (10 μl = 5 nMol) verdünnt. Damit enthielten gleiche Volumina beider Lösungen Substratmengen für gleichen NADPH-Verbrauch in der enzymatischen Umsetzung.

Für den Vergleich zwischen der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA und derjenigen von Oxalacetat in bezug auf die Tritiumübertragung vom tritiierten NADPH wurde, wie schon erwähnt, angestrebt, die Reaktionsbedingungen für beide Umsetzungen so identisch wie möglich zu halten.

Neben der Wahl eines für beide Enzymreaktionen gleichermaßen geeigneten Puffersystems mußte insbesondere dem Umstand Rechnung getragen werden, daß die Präparationen beider Enzyme, der HMG-CoA-Reduktase und der Malat-Dehydrogenase, nicht völlig rein waren, in unterschiedlichem Ausmaß eine unspezifische NADPH-Zersetzung in den Inkubationen verursachten und dadurch

den zur Substratreduktion zur Verfügung stehenden Coenzymgehalt verschieden stark verringerten. Um aber die Korrelierbarkeit zwischen der HMG-CoA-Reduktionsreaktion und der Oxalacetat-Reduktionsreaktion in bezug auf das Ausmaß der Tritiumübertragung vom tritiierten NADPH gewährleisten zu können, mußten alle Inkubationen wenigstens einen gleichstarken unspezifischen NADPH-Verbrauch aufweisen, wenn er schon nicht vermieden werden konnte. Auch der zeitliche Verlauf des NADPH-Umsatzes mußte während der eigentlichen Substratreduktion in allen Proben identisch sein.

Diese Forderungen können dadurch erfüllt werden, daß den Inkubationen beide Enzyme in gleicher Aktivität, bezogen auf den NADPH-Umsatz/min, zugegeben werden.

Am einfachsten wäre es gewesen, dazu beide Enzymlösungen im entsprechenden Verhältnis vorzumischen und gemeinsam in die Inkubationen zu pipettieren. In einem entsprechenden Versuch zeigte es sich jedoch, daß die Malat-Dehydrogenase in einer solchen Vormischung rasch inaktiviert wurde; pipettierte man dagegen beide Enzyme getrennt nacheinander in die Inkubationslösung, trat dieser Effekt nicht auf.

Als Puffer war K-Phosphatpuffer, pH 7.0, geeignet. Weiterhin enthielten alle Proben für die HMG-CoA-Reduktion EDTA und Cysteamin sowie MgCl_2 für die Oxalacetat-Reduktion. Die Richtung der Reduktionsreaktion wurde ausschließlich durch den Substratzusatz, HMG-CoA oder Oxalacetat, festgelegt.

Für den Vergleichsversuch wurden in Zentrifugengläser mit rundem Boden (HMG-CoA-Reduktion) bzw. konisch zulaufendem Boden (Oxalacetat-Reduktion) pipettiert:

0.10 ml 1.0 M K-Phosphatpuffer, pH 7.0, 0.02 ml 0.1 M Na-EDTA, pH 7.0, 0.02 ml 0.1 M MgCl_2 und $0.73 - x$ ml H_2O . Die Lösungen wurden in Eiswasser auf etwa 4°C abgekühlt und mit x ml (0.5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 und 250 μl) der HMG-CoA-Lösung (5 nMol HMG-CoA/10 μl) oder der Oxalacetat-Lösung (10 nMol Oxalacetat/10 μl) versetzt. Dann wurden nacheinander 26 μl HMG-CoA-Reduktase (20 mU, bezogen auf den NADPH-Umsatz/min),

20 μ l der Malatdehydrogenase aus Maisblättern (20.3 mU) und 0.05 ml einer nach Kap. 5.6.4. hergestellten (4R)-4-³H-NADPH-Lösung (= 70 nMol) hinzupipettiert, die Proben durchmischt und 30 min im Wasserbad bei 25° C inkubiert. Nach 3 min Erhitzen auf 85° C, Abkühlung und Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden den Proben, in denen Mevalonat gebildet worden war, je 20.0 μ l der ¹⁴C-Mevalonatlösung (Kap. 5.7.2.), den Proben, in denen Malat synthetisiert worden war, 20.0 μ l einer 0.05 M ¹⁴C-Malatlösung hinzugefügt. (Zur Herstellung dieses ¹⁴C-Malat-Standards waren 50 μ Ci L-¹⁴C-Äpfelsäure in 1 ml H₂O gelöst worden. Von dieser Lösung wurden 0.10 ml mit 8.78 ml einer 0.05 M Na-Malatlösung, pH 7.0, versetzt. 20.0 μ l dieses Standards enthielten 24,697 dpm).

Die Proben mit dem radioaktiven Mevalonat wurden zur Isolation des Mevalolactons gemäß Kap. 5.7.3. aufgearbeitet; zur Reinigung und Bestimmung des radioaktiven Malats aus den anderen Proben wurde eine Anionenaustauschchromatographie in Anlehnung an die zur Reinigung des Glykolats nach Kap. 5.8.1 durchgeführte Methode angewendet.

Hierzu wurden die Proben (1.0 ml) mit einer Pasteurpipette auf eine Austauschersäule (Bio-Rad AG 1x8, 200-400 mesh, Formiat-Form, Dimension 7 x 35 mm, in Kontes-Plastiksäulen) aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen mit 20 ml H₂O gewaschen und mit 1 N Ameisensäure eluiert. Die ersten 7 ml des Ameisensäure-Eluats wurden verworfen, die folgenden 5 ml in 25-ml-Bechergläsern aufgefangen. Diese Fraktion enthielt den größten Teil der Äpfelsäure, die allerdings noch mit tritiumhaltigen Begleitsubstanzen aus der NADPH-Zersetzung verunreinigt war. Zur vollständigen Reinigung wurde die Ameisensäure in den 25-ml-Bechergläsern durch Stehenlassen bei Raumtemperatur (2 Tage) verflüchtigt, der Rückstand in 1.0 ml H₂O aufgenommen und nochmals einer Ionenaustauschchromatographie nach der eben beschriebenen Weise unterworfen. Hierdurch konnten die tritiumhaltigen Verunreinigungen praktisch vollständig von der radioaktiven Äpfelsäure abgetrennt werden (Abb. 26):

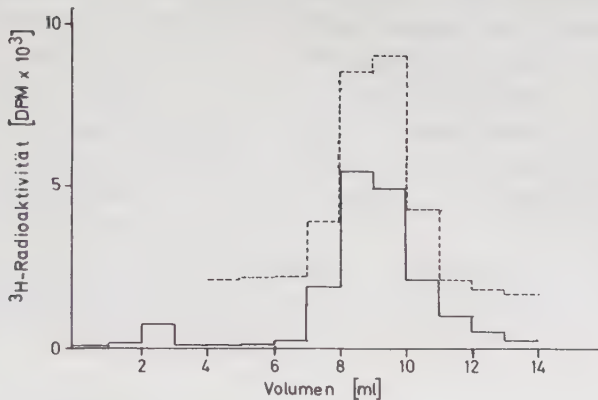


Abb. 26: Reinigung der enzymatisch gebildeten tritierten Äpfelsäure von tritierten Begleitsubstanzen durch repetitive Ionenaustauschchromatographie.

Säule: Dowex 1x8, 200-400 mesh, Formiat-Form; Dimension 7x35 mm. Elution mit 1 N Ameisensäure. ----- Elutionsdiagramm der Äpfelsäure nach der Inkubationsauftragung, — Elutionsdiagramm der Äpfelsäure nach Vorreinigung

Allerdings wurden dabei nach den ersten 7 ml nur noch die folgenden 4 ml des Ameisensäureeluats in Szintillationsfläschchen aufgefangen, um den Quenchgrad des Szintillationsmittels nicht zu stark zu erhöhen. Nach Zusatz von 10 ml Unisolve wurde der Gehalt an ^{14}C - und ^3H -Äpfelsäure im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer bestimmt. Die für die dpm-Berechnung benötigten Quenchkorrekturkurven waren mit Proben ausgemessen worden, die bekannte Mengen an ^{14}C - bzw. ^3H -Hexadecan-Standard, 10 ml Unisolve und steigende Mengen 1N Ameisensäure (0-4.5 ml) enthielten.

Tritiumgehalt des Inkubationswassers nach der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit (4R)-4- ^3H -NADPH

Um festzustellen, ob aufgrund einer Austauschreaktion eine Abhängigkeit zwischen dem Tritiumgehalt des Inkubationswassers und der bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit tritiiertem NADPH umgesetzten Substratmenge besteht, wurden zehn In-

kubationsansätze nach Kap. 5.7.1. in Zentrifugengläsern mit spitz zulaufendem Boden und Normalschliff NS 14/5 hergestellt. Nach beendetem Substratumsatz wurden die Proben jedoch nicht der Hitzedenaturierung unterworfen, sondern nach Zusatz von ^{14}C -Mevalonat bei -18°C eingefroren. Die Proben wurden zur Lyophilisation über entsprechende Schliffansätze und kleine Plastikschläuche einzeln mit kleinen Lösungsmittelfallen verbunden und diese wiederum kreisförmig über eine Glasspinne an eine Ölpumpe angeschlossen. Als Halterung diente ein Metallring mit angeschraubten Federklammern zur Befestigung von Proben-
gläsern und Fallen. Letztere tauchten in ein Dewargefäß ein und wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt (Abb. 27):

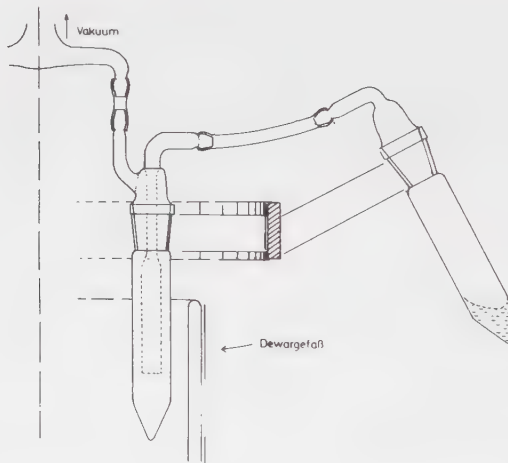


Abb. 27: Detailzeichnung der Vorrichtung zur gleichzeitigen Gefriertrocknung von zehn Enzyminkubationen mit getrennter Kondensation des absublimierten Wassers jeder einzelnen Probe.

Nach erneutem Einfrieren der Proben mit fl. N_2 wurde Vakuum angelegt. Das durch die Gefrier Trocknung aus den Proben absublimierende Wasser kondensierte in den Fallen; nach Auftauen wurden daraus Aliquote entnommen und auf Tritiumgehalt untersucht. Zur Isolation des radioaktiven Mevalonats wurde der Rückstand der lyophilisierten Proben in 0.5 ml H_2O aufgenommen, in Zentrifugengläser mit rundem Boden übergeführt und nach Trocknung in der üblichen Weise aufgearbeitet (Kap. 5.7.3.).

Seitenspezifität der Hydridübertragungsreaktion bei der Reduktion von HMG-CoA mit NADPH und HMG-CoA-Reduktase aus Bäckerhefe

Um die Frage beantworten zu können, ob und in welchem Ausmaß auch von der B-Seite des NADPH Wasserstoff bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA und Oxalacetat übertragen wird, wurden Probenreihen mit beiden Substraten zur Hälfte mit (4R)- und zur Hälfte mit (4S)-4- 3H -NADPH versetzt. Zur Herstellung der beiden Stereoisomeren wurden aus einer 0.2 ml 4- 3H -NAD $^{+}$ -Vorratslösung (Kap. 5.6.4.) entsprechend Kap. 5.8.1. zwei gleich große Mengen (4R)- und (4S)-4- 3H -NADP (je 70 nMol/0.05 ml) dargestellt. Die Zusammensetzung der Inkubationen war mit der des in Kap. 5.8.2. beschriebenen Vergleichsversuchs identisch, nur daß je zwei Probenreihen mit 0,10,50,100,150 und 200 μ l der HMG-CoA-Lösung (5 nMol/10 μ l) bzw. der Oxalacetat-Lösung (10 nMol/10 μ l) vorbereitet wurden, von denen jeweils eine Probenreihe mit HMG-CoA bzw. Oxalacetat-Zusatz mit (4R)-4- 3H -NADPH, die andere mit (4S)-4- 3H -NADPH (70 nMol) versetzt wurde. Isolation und Bestimmung des radioaktiven Mevalonats und Malats erfolgte ebenfalls in der in Kap. 5.8.2. angegebenen Weise; ein Teil des mit (4S)-4- 3H -NADPH gebildeten Mevalonats wurde säulenchromatographisch, ein anderer Teil mit der Dünnschichtchromatographie gereinigt, um sicherzugehen, daß das gemessene Tritium tatsächlich im Mevalolacton fixiert war. Die Ergebnisse dieses Versuches konnten in einem Wiederholungsexperiment bestätigt werden.

5.9. Zu Kap. 2.6. (Gehaltsbestimmung von HMG-CoA in der Rattenleber)

5.9.1. Stabilität von HMG-CoA in verdünnter Perchlorsäure

0.05 ml HMG-CoA-Lösung (Kap. 5.4.2.) wurden mit 1.00 ml eiskalter 6 %iger Perchlorsäure versetzt, nach bestimmten Zeiten (Abb. 19, S. 40) unter Eiskühlung mit 4 N KOH auf pH 6.5 titriert (0.15 ml), mit H_2O auf 2.5 ml aufgefüllt, das ausgefallene $KClO_4$ abzentrifugiert und 2 x je 1 ml des Überstandes enzymatisch auf den HMG-CoA-Gehalt getestet. Dazu wurden in eine 1-cm Glasküvette mit 3.00 ml Fassungsvermögen pipettiert: 1.45 ml 0.1 M K-Phosphatpuffer, pH 6.5, 0.05 ml 0.1 M Na-EDTA, pH 7.0, 0.05 ml 0.1 M Cysteamin, pH 7.0, 0.05 ml 0.01 M NADPH in 0.05 M $KHCO_3$, 0.35 ml H_2O und 0.05 ml HMG-CoA-Reduktase (ca. 35 mU). Dann wurde die Extinktion bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ \text{ C}$ bestimmt und die Reaktion durch die Zugabe von 1.00 ml der perchlorsäurebehandelten HMG-CoA-Lösung gestartet. Die rein durch die Verdünnung hervorgerufene Extinktionsveränderung war mit einem Ansatz ermittelt worden, dem statt der HMG-CoA-Lösung nur Wasser hinzupipettiert worden war.

5.9.2. HMG-CoA-Extraktion aus Rattenlebern

Die Ratten wurden durch einen Schlag mit der Schere auf den Schädel betäubt und das Genick durchgeschnitten. Das ausfließende Blut wurde für die Ketonkörper- und Glucose-Bestimmung (Kap. 5.11.2.) in einem 250 ml Becherglas (mit einem Tropfen Heparin (Liquemin) auf dem Boden) aufgefangen und nach kurzem Umschwenken zur gleichmäßigen Verteilung des Heparins in Eis aufbewahrt.

Der Bauch der Ratte wurde unterhalb des Rippenbogens aufgeschnitten, die Leber herauspräpariert und mit der vorgekühlten Frierstoppzange (scherenartiges Instrument mit zwei Aluminiumbacken, 90 x 55 x 10 mm, am vorderen Ende) zu flachen Scheiben von 1-2 mm Stärke zusammengepreßt. Überstehende Teile

wurden entfernt und der Rest unter Zerkleinerung rasch mit einer Pinzette in ein 25-ml-Becherglas gefüllt, das unter Kühlung mit fl. N_2 in einem starkwandigen Behälter aus Styropor (Fassungsvermögen für maximal 10 Gläser) aufbewahrt wurde. Sobald sechs Lebern fixiert worden waren, wurden die Bechergläser in die MVE-Tiefkühltruhe überführt und darin bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Diese Aufarbeitungsprozedur fand ausschließlich im Kühlraum bei $4^{\circ}C$ statt: Zur Perchlorsäure-Extraktion wurden die Lebern in einem Porzellanmörser unter drei-viermaligem Übergießen mit fl. N_2 staubfein zerrieben und von diesem Leberpulver 1.1 - 1.2 g in mit flüssigem Stickstoff gekühlte und vortarierte Plastik-Zentrifugenbecher (Sorvall Kat. Nr. 252, Polypropylen) gefüllt und ausgewogen (Mettler PN 320 überschalig). Die Becher wurden wieder kurz mit fl. Stickstoff gekühlt und pro 1.00 g Leberpulver 5.00 ml eiskalte 6 %ige Perchlorsäure hineinpipettiert. Die Proben wurden sofort 1 min mit Ultraschall homogenisiert. Durch dieses eben beschriebene Extraktionsverfahren wird verhindert, daß das Leberpulver auftaut, bevor es mit der Perchlorsäure in Berührung kommt (Hinweis von Dr. Heusinger, Labor Prof. Th. Bücher, München).

Das Homogenat wurde 10 min bei $6,000 \times g$ und $4^{\circ}C$ zentrifugiert, der Überstand quantitativ in ein vortariertes Zentrifugenglas gefüllt und zur Volumenbestimmung auf der Mettler-Waage ausgewogen (Die Dichte der Lösung konnte praktisch = 1 (g/ml) gesetzt werden). Von diesem Überstand wurden 4.50 ml in ein mit Eis gekühltes 25-ml-Becherglas pipettiert und unter Rühren mit einem Magnetrührer und einem kleinen Rührkern mit 4 N KOH auf pH 5-6 titriert. Die Kalilauge wurde dabei aus einer Mikrobürette zugetropft (ca. 0.60 ml); der pH-Wert der Lösung wurde mit einer eintauchenden Mikro-Glaselektrode kontrolliert.

Nach beendeter Titration wurde die Mischung in ein Zentrifugenglas abgegossen, das ausgefallene KClO_4 in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert und vom Überstand je 1.50 ml in zwei Zentrifugengläser mit rundem Boden pipettiert. Nach Zusatz von je 0.50 ml 1 M K-Phosphatpuffer, pH 6.5, wurden die Gläser mit Parafilm verschlossen und über Nacht bis zur enzymatischen Umsetzung bei -18°C aufbewahrt.

5.9.3. Gehaltsbestimmung von HMG-CoA in Leber-Extrakten

Zur Bestimmung des HMG-CoA-Gehaltes von Leberextrakten mußte eine Eichung des Tests mit synthetischem HMG-CoA durchgeführt werden, außerdem mußte die Wiederfindungsrate dieses Metaboliten nach der Perchlorsäureextraktion des Leberpulvers bekannt sein.

Die Eichung wurde für jede Testserie erneut durchgeführt, da die Ausbeute an tritiiertem NADPH von Ansatz zu Ansatz leicht schwankte.

Aus den in Kap. 2.6. erwähnten Gründen wurde die zur Eichung verwendete HMG-CoA-Lösung, deren Gehalt im optischen Test bestimmt worden war, wie das HMG-CoA der Rattenleber für kurze Zeit der Einwirkung von 6 %iger Perchlorsäure unterworfen.

Dazu wurde eine nach Kap. 5.4.2. hergestellte HMG-CoA-Lösung mit Wasser 1:5 verdünnt, so daß 10 μl der HMG-CoA Eichlösung je nach Synthese-Ansatz etwa 7.00 - 7.50 nMol Substrat enthielten. Von dieser Lösung wurden 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 und 15.0 μl mit 5.00 ml eiskalter 6 %iger Perchlorsäure versetzt, je 5 min unter Eiskühlung stehen gelassen und anschließend mit 4 N KOH, wie oben beschrieben, auf pH 5-6 titriert (ca. 0.85 ml). Die weitere Behandlung der Eichproben entsprach derjenigen der Leberextrakte.

Für Wiederfindungsversuche wurden 1.1 - 1.2 g einer gepulverten Rattenleber direkt mit Perchlorsäure extrahiert, parallel dazu aber die gleiche Menge des Leberpulvers in einen Zentrifugenbecher gefüllt, in den vor der Kühlung mit flüssigem

Stickstoff 20.0 μ l der HMG-CoA-Eichlösung hineinpipettiert worden waren, und ebenfalls mit Perchlorsäure homogenisiert und extrahiert.

Die Inkubationen zur Bestimmung des HMG-CoA-Gehaltes von Rattenlebern setzten sich wie folgt zusammen:

Zu den gerade aufgetauten Leberextrakten bzw. Eichproben wurden hinzupipettiert: 0.05 ml 0.1 M NA-EDTA, pH 7.0, 0.05 ml 0.1 M Cysteamin, pH 7.0. Dann wurde die Reaktion durch aufeinanderfolgende Zugabe von 0.05 ml HMG-CoA-Reduktase (ca. 35 mU) und 0.05 ml der nach Kap. 5.6.4. hergestellten Lösung von (4R)-4-³H-NADPH gestartet. Die weitere Behandlung der Proben sowie die Isolation und Bestimmung des radioaktiven Mevalonats erfolgte nach dem in Kap. 5.7.3. beschriebenen Verfahren.

Die in den Eichproben enthaltene HMG-CoA-Menge wurde nach der Gleichung

$$\text{nMol HMG-CoA (Eichprobe)} = \frac{c_H \cdot v_H}{v_P + v_H + v_K} \cdot v_A \quad (\text{Gl.12})$$

berechnet, wobei

c_H = Konzentration der eingesetzten HMG-CoA-Eichlösung (nMol/ml)

v_H = Volumen der eingesetzten HMG-CoA-Eichlösung (ml)

v_P = 5 = Volumen der zugesetzten Perchlorsäure (ml)

v_K = Volumen der zur Titration verwendeten KOH (ml)

v_A = 1.5 = Volumen des aus der neutralisierten Perchlorsäurelösung entnommenen Aliquots (ml)

bedeuten. Die so berechneten Werte wurden gegen die gemessenen ³H-dpm der entsprechenden Proben aufgetragen (Abb. 20, S. 40).

Anhand der damit vermittelten Eichgeraden wurden die in den Inkubationsproben der Leberextrakte enthaltenen HMG-CoA-Mengen bestimmt. Mit diesen Werten konnte die HMG-CoA-Konzentration des eingesetzten Leberpulvers und damit der entsprechenden Rattenleber nach der Beziehung

$$c_{\text{HMG-CoA}} (\text{nMol/g Leber}) = \frac{\frac{v_A + v_K}{v_A} \cdot v_P \cdot H}{v_B \cdot L \cdot W} \quad (\text{Gl. 13})$$

berechnet werden, wobei

- $v_A = 4.5$ = Volumen des aus dem Perchlorsäureextrakt der Leber zur Neutralisation entnommenen Aliquots (ml)
- v_K = Volumen der zur Neutralisation von v_A benötigten KOH (ml)
- v_P = Volumen des Überstandes der Perchlorsäureextraktion (ml)
- H = mit der Eichgerade ermittelte HMG-CoA-Menge in der Inkubation (nMol)
- $v_B = 1.5$ l Volumen des zur Inkubation verwendeten Aliquots des neutralisierten Perchlorsäureextraktes (ml)
- L = Gewicht des extrahierten Leberpulvers (g)
- $W = 0.93$ = Wiederfindungsrate für HMG-CoA nach der Perchlorsäureextraktion (%/100)

bedeuten.

5.10. Zu Kap. 2.7. (Identitätsbeweise für das zelluläre HMG-CoA)

In der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Weise wurden Leberextrakte und Eichproben mit synthetischem HMG-CoA hergestellt, nur daß als Puffer 1.0 M K-Phosphat-Puffer von pH 7.0 statt 6.5 verwendet wurde, da die Lyase bei pH 6.5 nur noch geringe Aktivität entfaltet. Diese Proben (2.00 ml) wurden mit 0.05 ml 0.1 M MgCl_2 , 0.05 ml 0.1 M Na-EDTA, pH 7.0, 0.05 ml 0.1 M Cysteamin und 0.10 ml HMG-CoA-Lyase (6.6 mU bei pH 7.0) bzw. 0.10 ml 0.05 M Trispuffer, pH 7.5, versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 25° C wurden 0.05 ml der üblichen (4R)-4-³H-NADPH Lösung sowie 0.05 ml HMG-CoA-Reduktase (35 mU) hinzupipettiert.

Nach weiteren 60 min bei 25° C wurden die Proben 3 min auf 85° C erhitzt, abkühlen gelassen und nach Zugabe von je 27,000 dpm ¹⁴C-Mevalonat nach dem üblichen Verfahren aufgearbeitet (Kap. 5.7.3.).

5.11. Zu Kap. 3. (Der HMG-CoA-Gehalt der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen)

5.11.1. Ratten, Käfige und Standarddiät

Die Tiere wurden maximal zu viert in Makrolonkäfigen mit der Grundfläche 36 x 20 cm gehalten. Als Standardfutter diente Altromin R 1324, ad libitum. Die Käfige befanden sich in einem fensterlosen, klimatisierten Raum mit einer Temperatur von 23° C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 %. Die Beleuchtung wurde automatisch um 7 Uhr MEZ ein- und um 19 Uhr MEZ ausgeschaltet. Die Ratten wurden während der Hellperiode so wenig wie möglich gestört. Alle Tiere wurden zur Adaption an die Umgebung nach Lieferung mindestens eine Woche unter diesen Bedingungen gehalten, bevor mit den Experimenten begonnen wurde.

5.11.2. Bestimmung der Ketonkörper und der Glucose im Blut

In allen Tierversuchen wurde parallel zum HMG-CoA in der Leber auch die Ketonkörperkonzentration im Blut der Ratten, im Diabetes-Versuch zusätzlich auch der Blutzucker gemessen. Dazu wurden 1.00 ml des im 250 ml-Becherglas aufgefangenen heparinisierten Blutes einer geschlachteten Ratte (Kap. 5.9.2.) in ein Zentrifugenglas mit 3.00 ml eiskalter 4 %iger HClO₄ pipettiert, mit dem Whirlmix homogenisiert und 3 min bei 4,000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein Zentrifugenglas abgegossen und mit 0.15 ml 5 N KOH neutralisiert; der KClO₄-Niederschlag wurde 1 min bei 4,000 Upm abzentrifugiert und die Probe mit Eis gekühlt.

Wegen der Empfindlichkeit des Acetoacetats wurde dieser Metabolit zuerst bestimmt. Dazu wurden in eine 1-cm-Glasküvette mit 1.5 ml Fassungsvermögen pipettiert: 0.50 ml einer Lösung

von 2,6 μMol NADH in 10 ml 0,2 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,5, und 0,20 ml des neutralisierten Blutextraktes. Dann wurde bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ \text{ C}$ die Grundextinktion bestimmt und die enzymatische Umsetzung durch Zugabe von 0,01 ml (= 150 mU) β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase gestartet.

Für den Test auf β -Hydroxybutyrat wurden in einer 1-cm Glas-Küvette miteinander gemischt: 0,50 ml einer Lösung von 9 μMol NAD^+ in einer Mischung aus 2,0 ml 0,2 M Trispuffer, pH 8,5, 3,89 ml H_2O und 0,11 ml 24 %igem Hydrazinhydrat, sowie 0,20 ml des Blutextraktes. Nach der Bestimmung der Grundextinktion bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ und $T = 25^\circ \text{ C}$ wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,01 ml β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase gestartet.

Zur Blutzucker-Bestimmung wurden in der Küvette gemischt: 0,93 ml einer Lösung von 3,5 μMol NADP^+ und 10 μMol ATP in 10 ml 0,2 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,5, (4 mM an MgCl_2), und 0,02 ml des neutralisierten Blutextraktes. Nach der Bestimmung der Grundextinktion wurden 0,005 ml einer Enzymmischung aus Hexokinase und G-6-P-Dehydrogenase zugegeben.

5.11.3. Tag- und Nachtrhythmus der Ratten

Für die Bestimmung des HMG-CoA-Gehaltes der Leber in Abhängigkeit vom Lebensrhythmus der Ratten wurden an einem Tag um 24, 6 und 18 Uhr und am darauffolgenden Tag um 12 Uhr je fünf Ratten geschlachtet und ihre Lebern gleich im Anschluß an die Schlachtung aufgearbeitet. Die neutralisierten Leberextrakte wurden nach Pufferzusatz bei -18° C aufbewahrt und gesammelt und nach der letzten Schlachtung gemeinsam weiterverarbeitet.

5.11.4. Gehungerte Ratten

Für die Untersuchung der HMG-CoA-Konzentration in den Lebern gehungerter Ratten wurde sechs Tieren 24 Stunden vor der Schlachtung das Futter entzogen, die Kontrolltiere wurden normal weitergefüttert. Beide Versuchstiergruppen wurden um 10 Uhr geschlachtet.

5.11.5. Alloxandiabetische Ratten

Wegen des zu erwartenden Ausfalls einiger Versuchstiere aufgrund nichtansprechender Alloxanbehandlung wurden mehr Ratten (24 Stück) alloxanisiert, als für den eigentlichen HMG-CoA-Test benötigt wurden.

24 Stunden vor der Alloxanspritzung wurde den Tieren das Futter entzogen. Um 10 Uhr wurde den Ratten pro 100 g Körpergewicht 0.10 ml einer frisch hergestellten Lösung von 100 mg Alloxan/1.00 ml physiol. Kochsalzlösung in eine der Schwanzvenen gespritzt. Zu diesem Zweck waren die Ratten zuvor leicht mit Äther narkotisiert und der Schwanz zur Gefäßerweiterung kurz in warmes Wasser getaucht worden. Während der Alloxanspritzung wurden von einer zweiten Person mit den Daumen die beiden Nieren vom Kreislauf abgeklemmt, um ein akutes Nierenversagen durch die massive Alloxangabe zu verhindern.

Die nichtdiabetischen Kontrollratten wurden der gleichen Behandlung unterworfen, nur daß statt der Alloxanlösung reine physiol. Kochsalzlösung gespritzt wurde.

Anschließend wurden die Ratten wieder in die Käfige gesetzt und mit Altromin ad libitum versorgt. 24 Stunden nach der Alloxangabe erhielten die alloxanisierten Ratten die ersten 2 I.E. Depot-Insulin (subkutan in die Nackenfalte); die Substitution mit jeweils 2 I.E. Depot-Insulin wurde morgens und abends eine Woche lang fortgeführt, um die Ratten wieder in einen guten Allgemeinzustand zu bringen. Den Kontrollratten wurde statt des Insulins physiol. Kochsalzlösung gespritzt.

Bei einem Teil der diabetischen Tiere (14 St.) wurde 24 Stunden vor der Schlachtung die Insulinsubstitution abgebrochen.

Alle diese Ratten entwickelten im Verlauf des Tages einen akuten Diabetes, der sich deutlich in einer starken Abnahme des Körpergewichts äußerte:

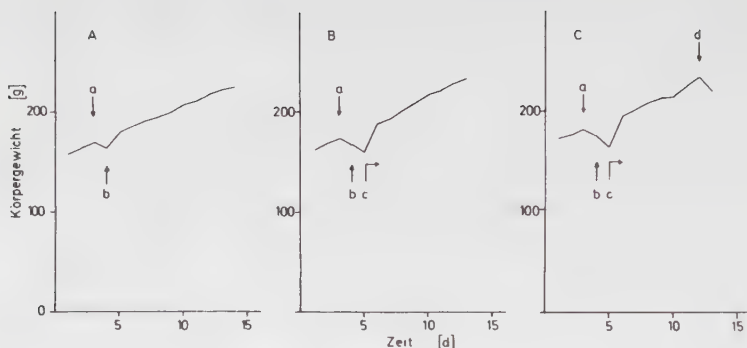


Abb. 28: Körpergewichtsdiagramme von Ratten im Diabetes-Versuch.

A: Diagramm einer scheinbehandelten Ratte, B und C zweier alloxanisierter Tiere mit durchgehender Insulin-Substitution (B) bzw. Abbruch der Insulingaben 24 Stunden vor Schlachtung (C).

Zeitpunkte (a): Futterentzug, (b) Injektion der physiol. Kochsalzlösung (Ratte A) bzw. des Alloxans (Ratten B + C), (c) Beginn der Insulinsubstitution, (d) Abbruch der Insulin-substitution.

Für den HMG-CoA-Test wurden die Lebern der Ratten verwendet, die die höchste Ketonkörperkonzentration im Blut aufgewiesen hatten.

5.11.6. Cholesterolfütterte Ratten

Für die Herstellung des cholesterolhaltigen Futters wurde Altromin zerkleinert und im Mixer pulverisiert. Zu 485 g dieses Pulvers wurden 15 g Cholesterol hinzugefügt, vermischt und das Gemisch in einer Teiggrührmaschine (Bosch-Küchenmaschine) mit 350 ml H_2O zu einer feuchten Masse verrührt. Daraus wurden von Hand Futterpellets von der ursprünglichen Form hergestellt und einige Tage an der Luft getrocknet. Um sicherzustellen, daß bei dieser Behandlung im Futter keine Veränderun-

gen der Futterzusammensetzung eingetreten waren, die unabhängig vom Cholesterol einen Einfluß auf den HMG-CoA-Stoffwechsel ausübten, wurde die Nahrung für die Kontrolltiere in gleicher Weise, nur ohne Cholesterolzusatz hergestellt.

48 Stunden vor der Schlachtung wurde die Standarddiät der Ratten gegen das cholesterolhaltige- bzw. scheinbehandelte Altromin ausgetauscht. Schlachtzeitpunkt war 22 Uhr. Zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktaseaktivität (76) wurde von den Lebern vor der Frierstoppfixierung ein kleines Stück von etwa 700 mg Gewicht abgeschnitten.

6. Zusammenfassung

Auf der Grundlage der Isotopenmarkierung durch eine spezifische enzymatische Umwandlung wurde ein empfindliches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des HMG-CoA-Gehaltes von Rattenlebern entwickelt.

HMG-CoA aus enteiweißten Leberextrakten wird mit (4R)-4-³H-NADPH und HMG-CoA-Reduktase aus Hefe reduziert. Das gebildete tritiierte Mevalonat wird als Lacton nach einer Ätherextraktion dünn-schicht- oder säulenchromatographisch gereinigt und sein Tritiumgehalt mit einem Flüssigkeitsszintillations-spektrometer bestimmt. Zur Korrektur der Isolationsausbeute wird ¹⁴C-Mevalonat als interner Standard verwendet.

Mit diesem Verfahren konnte untersucht werden, wie die Stationärkonzentration des HMG-CoA im Lebergewebe der Ratte von Stoffwechselbedingungen beeinflusst wird, die mit einer deutlichen Veränderung in der Biosyntheserate der Folgeprodukte dieses Metaboliten, der Ketonkörper und des Cholesterols, einhergehen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, daß die Stationärkonzentration von HMG-CoA, die im Normalzustand durchschnittlich 7 nMol/g Leber beträgt, von regulatorischen Einflüssen, die eine zum Teil erhebliche Veränderung der Kapazitätsauslastung des HMG-CoA-Stoffwechsels verursachen, weitgehend unberührt bleibt:

Im Gegensatz zur Cholesterolbiosynthese unterliegt der HMG-CoA-Gehalt der Rattenleber keinen tageszeitlichen Schwankungen. Cholesterolfütterung erniedrigt die HMG-CoA-Konzentration um das 0.3-fache, bleibt aber ohne Auswirkungen auf den Blut-Ketonkörperspiegel. Wesentlich erhöhte Ketogeneseraten bei gehungerten und diabetischen Tieren sind von einem 0.3-0.7-fachen Anstieg der HMG-CoA-Konzentration begleitet.

Aus der Korrelation dieser Befunde mit der HMG-CoA-Synthase-aktivität unter vergleichbaren Stoffwechselbedingungen wird gefolgert, daß Veränderungen im HMG-CoA-Spiegel der Leber in erster Linie von Schwankungen in der Synthese- und nicht der Verbrauchsrate dieses Metaboliten herrühren.

Untersuchungen zur Tritiumübertragungsreaktion bei der enzymatischen Reduktion von HMG-CoA mit tritiiertem NADPH zeigten, daß die HMG-CoA-Reduktase-Präparation aus Hefe in der Lage ist, neben dem Wasserstoff von der A-Seite auch in geringem Ausmaß Wasserstoff von der B-Seite des Coenzyms auf das Substrat zu übertragen.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Lynen, F., U. Henning, C. Bublit, B. Sörbo und L. Kröplin-Rueff: Biochem. Z. 330, 269 (1958)
- 2) Bucher, N.L.R., P. Overath und F. Lynen: Biochim. Biophys. Acta 40, 491 (1960)
- 3) Hilz, H., J. Knappe, E. Ringelmann und F. Lynen: Biochem. Z. 329, 476 (1958)
- 4) McGarry, J.D. und D.W. Foster: J. Biol. Chem. 244, 4251 (1969)
- 5) Lynen, F.: Vortrag bei der Chem. Gesellschaft, Freiburg, (1951)
- 6) Lynen, F.: Nature 174, 962 (1954)
- 7) Bloch, K. und D. Rittenberg: J. Biol. Chem. 145, 625 (1942)
- 8) Bloch, K., E. Borek und D. Rittenberg: J. Biol. Chem. 162, 441 (1946)
- 9) Bloch, K.: Harvey Lect. Ser. 48, 68 (1952-1953)
- 10) Lynen, F., E. Reichert und L. Rueff: Ann. Chem. 574, 1 (1951)
- 11) Robinson, W.G., B.K. Bachhawat und M.J. Coon: Fed. Proc. 14, 270 (1955)
- 12) Skeggs, H.R., L.D. Wright, E.L. Cresson, G.D.E. McRae, C.H. Hoffmann, D.E. Wolf und K. Folkers: J. Bacteriol. 72, 519 (1956)
- 13) Wolf, D.E., C.H. Hoffmann, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs, L.D. Wright und K. Folkers: J. Am. Chem. Soc. 78, 4499 (1956)
- 14) Tavormina, P.A., M.H. Gibbs und J.W. Huff: J. Am. Chem. Soc. 78, 4498 (1956)
- 15) Tavormina, P.A. und M.H. Gibbs: J. Am. Chem. Soc. 78, 6210 (1956)

- 16) Lynen, F., H. Eggerer, U. Henning, J. Knappe, I. Kessel und E. Ringelmann: Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols. London, I. and A. Churchill Ltd., 1959. S. 95.
- 17) Ferguson, J.J., jr., I.F. Durr und H. Rudney: Fed. Proc. 17, 219 (1958)
- 18) Ferguson, J.J., jr., I.F. Durr und H. Rudney: Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 45, 499 (1959)
- 19) Bucher, N.L.R., P. Overath und F. Lynen: Fed. Proc. 18, 20 (1959)
- 20) Knappe, J., E. Ringelmann und F. Lynen: Biochem. Z. 332, 195 (1959)
- 21) Rétey, J., E.v. Stetten, U. Coy und F. Lynen: Eur. J. Biochem. 15, 72 (1970)
- 22) Qureshi, N., R.E. Dugan und J.W. Porter: 168. Natl. Meeting Amer. Chem. Soc. 1974, Abstr. No. 58 (1974)
- 23) Hamprecht, B.: Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München (1968)
- 24) Higgins, M.J.P., D. Brady und H. Rudney: Arch. Biochem. Biophys. 163, 271 (1974)
- 25) Dempsey, M.E. (Literaturübersicht): Ann. Reviews of Biochemistry, Ann. Reviews Inc., Palo Alto, California, Bd. 43, S. 967 (1974)
- 26) Ferguson, J.J., jr. und H. Rudney: J. Biol. Chem. 234, 1076 (1959)
- 27) Ferguson, J.J., jr. und H. Rudney: J. Biol. Chem. 234, 1072 (1959)
- 28) Rudney, H., P.R. Stewart, P.W. Majerus und P.R. Vagelos: J. Biol. Chem. 241, 1226 (1966)
- 29) Greville, G.D., und P.K. Tubbs: Essays in Biochemistry 4, 155. Ed. P.N. Campbell and G.D. Greville. Acad. Press, London, 1968.

- 30) Brodie, J.D., G. Wasson und J.W. Porter: J. Biol. Chem. 238, 1294 (1963)
- 31) Higgins, M.J.P., und R.G.O. Kekwick: Biochem. J. 134, 295 (1973)
- 32) Barth, C.A., H.J. Hackenschmidt, E.E. Weis und K.F.A. Decker: J. Biol. Chem. 248, 738 (1973)
- 33) Middleton, B., und P.K. Tubbs: Biochem. J. 137, 15 (1974)
- 34) Gerhardt, C.: Wien. Med. Presse 6, 672 (1865)
- 35) Geelmuyden, H.C.: Z. Physiol. Chem. 23, 431 (1897)
- 36) Embden, G., und H. Marx: Hofmeisters Beitr. Physiol. Path. 11, 318 (1908)
- 37) Lynen, F., L. Wessely, O. Wieland und L. Rueff: Angew. Chem. 64, 687 (1952)
- 38) Stern, J.R., M.J. Coon und E. Del Campillo: J. Am. Chem. Soc. 75, 1517 (1953)
- 39) Mahler, H.R.: Fed. Proc. 12, 694 (1953)
- 40) Stern, J.R., M.J. Coon und A. Del Campillo: Nature 171, 28 (1953)
- 41) Clinkenbeard, K.D., T. Sugyama, J. Moss, W.D. Reed und M. D. Lane: J. Biol. Chem. 248, 2275 (1973)
- 42) Decker, K. und C. Barth: Mol. Cell. Biochemistry 2, 179 (1973)
- 43) Dietschy, J.M., und J.D. McGarry: J. Biol. Chem. 249, 52 (1974)
- 44) Grosse-Brockhoff, F. (Hrsg.): Pathologische Physiologie. Springer-Verlag, Berlin, 2. Aufl., S. 664 (1969)
- 45) Gould, R.G.: Biosynthesis of Cholesterol. In: Cholesterol (R.P. Cook, ed.). Acad. Press, New York (1958)
- 46) Wieland, O.: Ketogenesis and its Regulation. In: Advances in Metabolic Disorders. Acad. Press, New York, Bd. 3, S. 1 (1968)

- 47) Wieland, O., G. Löffler, L. Weiss und I. Neufeldt: Biochem. Z. 333, 10 (1960)
- 48) Ross, B.D. und O. Wieland: Abstr. 5th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc., Prag 1968, S. 139
- 49) Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- 50) Kirtley, M.E., und H. Rudney: Biochemistry 6, 230 (1967)
- 51) Lynen, F. und M. Graßl: Z. Physiol. Chem. 313, 291 (1958)
- 52) Buckel, W. und H. Eggerer: Biochem. Z. 343, 29 (1965)
- 53) Dugan, R.E. und J.W. Porter: J. Biol. Chem. 246, 5361 (1971)
- 54) Blattmann, P. und J. Rétey: Z. Physiol. Chem. 352, 369 (1971)
- 55) Nakamoto, T. und B. Vennesland: J. Biol. Chem. 235, 202 (1960)
- 56) Freudenthal, R.I., J.A. Kepler und C.E. Cook: Anal. Biochem. 51, 632 (1973)
- 57) San Pietro, A. In: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, eds.). Acad. Press, London, Bd. IV, S. 840 (1957)
- 58) Stern, B.K. und B. Vennesland: J. Biol. Chem. 235, 205 (1960)
- 59) Horecker, B.L. und P.Z. Smyrniotis: Biochim. Biophys. Acta 12, 98 (1953)
- 60) Cornforth, J.W. und andere: (Discussion Meeting) Proc. Roy. Soc. 163 B, 452 (1966)
- 61) Wang, T.P., N.O. Kaplan und F.E. Stolzenbach: J. Biol. Chem. 211, 465 (1966)
- 62) Simon, H. und D. Palm: Angew. Chem. 78, 993 (1966)
- 63) Palm, D.: Angew. Chem. 80, 706 (1968)
- 64) Krakow, G., J. Ludowieg, J. Mather, W. Normore, L. Tosi, S. Udaka und B. Vennesland: Biochemistry 2, 1009 (1963)

- 65) Johnson, H.S., und M.D. Hatch: Biochem. J. 119, 273 (1970)
- 66) Davies, D.D., A. Teixeira und P. Kenworthy: Biochem. J. 127, 335 (1972)
- 67) Hohorst, H.J., F.H. Kreutz und Th. Bücher: Biochem. Z. 332, 18 (1959)
- 68) Seitz, H.J., R.P. Faupel, S.C. Kampf und W. Tarnowski: Arch. Biochem. Biophys. 158, 12 (1973)
- 69) Faupel, R.P., H.J. Seitz, W. Tarnowski sowie V. Thiemann und Ch. Weiss: Arch. Biochem. Biophys. 148, 509 (1972)
- 70) Siedel, J. und F. Lynen: Abstr. 9th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc., Budapest 1974, S. 369
- 71) Back, P., B. Hamprecht und F. Lynen: Arch. Biochem. Biophys. 133, 11 (1969)
- 72) Hamprecht, B., C. Nüssler und F. Lynen: FEBS Lett. 4, 117 (1969)
- 73) Stern, J.R. und S. Ochoa: J. Biol. Chem. 191, 161 (1951)
- 74) Krebs, H.A. In: Advances in Enzyme Regulation (G. Weber, ed.). Pergamon Press, Oxford, Bd. 4, S. 339 (1966)
- 75) Werk, E.E. und H.C. Knowles: Diabetes 10, 22 (1961)
- 76) Huber, J., S. Latzin und B. Hamprecht: Z. Physiol. Chem. 354, 1645 (1973)
- 77) Williamson, D.H., M.W. Bates und H.A. Krebs: Biochem. J. 108, 353 (1968)
- 78) White, L.W. und H. Rudney: Biochemistry 9, 2725 (1970)
- 79) Huth, W., C. Dierich, V.v. Oeynhausien und W. Seubert: Z. Physiol. Chem. 354, 635 (1973)
- 80) McNamara, D.J. und V.W. Rodwell: Regulation of "Active Isoprene" Biosynthesis . In: Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells (Kun und Grisolia, eds.). Wiley Interscience, New York (1972)

- 81) Zuurendonk, P.F. und J.M. Tager: Biochim. Biophys.
Acta 333, 393 (1974)
- 82) Hamprecht, B. und F. Lynen: Eur. J. Biochem. 14, 323
(1970)

Lebenslauf

Am 23. 3. 1948 wurde ich als Sohn des Chemieprofessors Dr. W. Siedel und seiner Ehefrau Helene Siedel, geb. Graf, in München geboren. Nach Beendigung der Volksschule in Bad Soden am Taunus besuchte ich das Leibniz-Realgymnasium in Frankfurt-Höchst, an dem ich 1966 das Abitur ablegte. 1966 nahm ich an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main das Studium der Chemie auf, das 1967 durch die Einberufung zur Bundeswehr unterbrochen wurde. Nach Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer setzte ich mein Studium im Herbst 1967 fort. Nach der Vordiplomprüfung wechselte ich 1969 zur Ludwig-Maximilians-Universität in München über, wo ich im Februar 1972 die mündliche Diplomhauptprüfung ablegte. Anschließend fertigte ich bis Februar 1975 am Institut für Biochemie, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Universität München, sowie am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit an.

